

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

22.11.01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2001年 5月24日

REC'D 18 JAN 2002

出 願 番 号
Application Number:

特願2001-156088

WIPO PCT

出 願 人
Applicant(s):

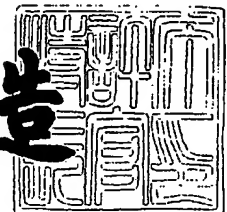
大野 茂男

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2001年12月28日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3111693

【書類名】 特許願

【整理番号】 YLS01001P

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 14/00

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都目黒区八雲4-4-8

 【氏名】 大野 茂男

【特許出願人】

 【住所又は居所】 東京都目黒区八雲4-4-8

 【氏名又は名称】 大野 茂男

【代理人】

 【識別番号】 100090251

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 森田 憲一

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 017813

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規なSMG-1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列を含むポリペプチド、あるいは、
(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列の1又は複数の箇所において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、SMG-1活性を示すポリペプチド。

【請求項2】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項3】 請求項2に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項4】 請求項3に記載の発現ベクターでトランスフェクションされた細胞。

【請求項5】 請求項1に記載のポリペプチドに結合する抗体。

【請求項6】 (1) 請求項1に記載のポリペプチドと、(2) Upf1/SMG-2と、(3) 試験化合物とを接触させる工程、及び
前記ポリペプチドと前記Upf1/SMG-2と前記試験化合物とを接触させた状態で、リン酸化反応を実施し、Upf1/SMG-2がリン酸化されたか否かを分析する工程
を含むことを特徴とする、前記ポリペプチドのSMG-1活性を阻害する物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、SMG-1に関する。

【0002】

【従来の技術】

真核生物には、プロモーター部位は正常の遺伝子と同じにもかかわらず、遺伝

子の本来の翻訳領域の途中のコドンがストップコドンに変異したナンセンス変異 mRNA を認識して、特異的に分解する機構として、ナンセンス媒介 mRNA 崩壊 (nonsense-mediated mRNA decay; NMD) が存在する。この機構に関与している遺伝子として、酵母から3つの遺伝子 (UPF1、UPF2、及びUPF3) が、そして、線虫から7つの遺伝子 (SMG-1～SMG-7) が報告されている。これらの遺伝子の変異体生物では、ナンセンス変異 mRNA の特異的な分解が抑制されることも報告されている。なお、酵母UPF1タンパク質と線虫SMG-2タンパク質とは、高いアミノ酸配列の相同性を有している。また、酵母UPF1遺伝子と高い塩基配列の相同性を有するヒト遺伝子及びマウス遺伝子として、Rent1/HUPF1が単離され、この遺伝子は、UPF-1変異体酵母において、UPF-1の機能を相補することが示されている (以下、Rent1/HUPF1を、単に「ヒトUPF1」と称する)。また、844位アルギニンをシステインに変異させた変異型ヒトUPF1タンパク質を動物細胞内で発現させると、ナンセンス変異 mRNA の特異的な分解の抑制がみられる。なお、これらの遺伝子の変異体は致死性でないので、生存に必須の遺伝子ではないと考えられる。

【0003】

UPF1/SMG-2タンパク質は、Znフィンガーモチーフ及びRNAヘリカーゼ様の構造をもち、mRNAの分解を担う複合体のユニットとして働いていると考えられている。また、その他の遺伝子は、この酵素の活性や局在等の調節を行なっていると考えられている。線虫では、SMG-2タンパク質がリン酸化を受けていること、そして、SMG-1、SMG-3、又はSMG-4の各遺伝子の変異体の線虫では、SMG-2タンパク質のリン酸化が起きないことが報告されている。また、線虫SMG-1のcDNAの塩基配列が報告されており、SMG-1タンパク質は、フォスファチジルイノシトールキナーゼ関連キナーゼ (phosphatidylinositol kinase related kinase; PIKK) と呼ばれる一群のセリン/スレオニンキナーゼのファミリーで保存されているキナーゼドメインと高い相同性を有するキナーゼドメインを有しており、PIKKファミリーと考えられる。また、ショウジョウバエ

のゲノム遺伝子の塩基配列からショウジョウバエ SMG-1 と考えられる配列が報告されている。しかし、ヒトを含め、哺乳類の SMG-1 遺伝子の塩基配列及びそれがコードする SMG-1 タンパク質のアミノ酸配列は明らかにされていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者は、新規のフォスファチジルイノシトールキナーゼ (PIK) - 関連キナーゼ (PIKK) の取得を目的に、鋭意探求したところ、新規のヒト SMG-1 タンパク質及びそれをコードする DNA を取得した。しかも、本発明者は、前記ヒト SMG-1 が自己リン酸化及び UPF1/SMG-2 をリン酸化する活性を有すること、そして、UPF1/SMG-2、UPF2、及び UPF3 と共に免疫沈降することから、NMD の引き金を引く、いわゆる、サーベイランス複合体の構成員であることを始めて示すと同時に、SMG-1 の点変異体を用いて実際に哺乳類細胞で SMG-1 が NMD に必須であることを証明した。更には、ヒト SMG-1 を阻害することにより、NMD を抑制可能であることを新たに見出した。本発明はこのような知見に基づくものである。

従って、本発明の課題は、新規のフォスファチジルイノシトールキナーゼ (PIK) - 関連キナーゼ (PIKK)、及びそれをコードする新規のポリヌクレオチドを提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明は、(1) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 129 番目～第 3657 番目のアミノ酸からなる配列を含むポリペプチド、あるいは、(2) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列における第 129 番目～第 3657 番目のアミノ酸からなる配列の 1 又は複数の箇所において、1 又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、及び/又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、SMG-1 活性を示すポリペプチドに関する。

また、本発明は、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。

また、本発明は、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターに関する。

また、本発明は、前記発現ベクターでトランスフェクションされた細胞に関する。

また、本発明は、前記ポリペプチドに結合する抗体に関する。

更に、本発明は、(1) 前記ポリペプチドと、(2) Upf1/SMG-2と、(3) 試験化合物とを接触させる工程、及び

前記ポリペプチドと前記Upf1/SMG-2と前記試験化合物とを接触させた状態で、リン酸化反応を実施し、Upf1/SMG-2がリン酸化されたか否かを分析する工程

を含むことを特徴とする、前記ポリペプチドのSMG-1活性を阻害する物質のスクリーニング方法に関する。

【0006】

本明細書において「SMG-1活性」とは、Upf1/SMG-2 [Sun, Xら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 10009-10014 (1998); 及びBhattacharya, A. ら, Rna, 6, 1226-1235 (2000)] をリン酸化する活性を意味する。

【0007】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明者は、3657個のアミノ酸残基からなる新規PIKK、すなわち、ヒトSMG-1を見出した。そのアミノ酸配列は、配列番号2で表わされる配列における第1番～第3657番のアミノ酸からなる配列で示される。更に、本発明者は、この新規タンパク質の第107番目～第3657番目のアミノ酸残基からなるC末端側部分断片、あるいは、第129番目～第3657番目のアミノ酸残基からなるC末端側部分断片も、十分なSMG-1活性を有することを見出した。本発明はこのような知見に基づくものである。

【0008】

本発明のポリペプチドには、

(1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列を含むポリペプチド；

(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列の1又は複数の箇所において、1又は複数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、SMG-1活性を示すポリペプチド（以下、機能的等価改変体と称する）；並びに

(3) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列との同一性、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列との同一性、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第107番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列との同一性が90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、SMG-1活性を示すポリペプチド（以下、相同ポリペプチドと称する）が含まれる。

【0009】

本発明のポリペプチドである「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列を含むポリペプチド」は、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列を含み、しかも、SMG-1活性を示すポリペプチドである限り、特に限定されるものではなく、例えば、

(1a) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第107番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列を有するポリペプチド；

(1b) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第107番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列のN末端及び／又はC末端に、適当なマーカー配列等が付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、SMG-1活性を示す融合ポリペプチド；

(1c) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(1d) 配列番号2で表されるアミノ酸配列のN末端及び／又はC末端に、適当なマーカー配列等が付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、SMG-1活性を示す融合ポリペプチド；

(1e) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列を有するポリペプチド；並びに

(1f) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列のN末端及び／又はC末端に、適当なマーカー配列等が付加されたアミノ酸配列を有し、しかも、SMG-1活性を示す融合ポリペプチドなどが含まれる。

【0010】

本明細書において、試験対象であるポリペプチドが「SMG-1活性を示す」か否かを判定する方法は、特に限定されるものではないが、例えば、前記の試験ポリペプチドと、Upf1/SMG-2（例えば、ヒトUpf1/SMG-2）とを接触させた状態で、リン酸化反応を実施し、Upf1/SMG-2がリン酸化されたか否かを分析することにより、確認することができ、具体的には、例えば、後述の実施例9（1）に記載の方法で確認することができる。

【0011】

前記ポリペプチド（1a）、すなわち、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第107番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列を有するポリペプチド」は、SMG-1活性を示す、3551個のアミノ酸残基からなる新規タンパク質である。前記ポリペプチド（1a）は、前記ポリペプチド（1c）、すなわち、「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」の部分ポリペプチドに相当する。

前記ポリペプチド（1c）は、分子量約430kDaの新規タンパク質であり、後述する実施例において「p430」と称するタンパク質である。

また、前記ポリペプチド（1e）、すなわち、「配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列を有するポリペプチド」は、SMG-1活性を示す、3529個のアミノ酸残基からなる新規タンパク質であり、前記ポリペプチド（1c）の部分ポリペプチドに相当する。前記ポリペプチド（1e）は、分子量約400kDaの新規タンパク質であり、後述する実施例において「p400」と称するタンパク質である。

【0012】

本発明のポリペプチドにおける前記マーカー配列としては、例えば、ポリペプ

チドの発現の確認、細胞内局在の確認、あるいは、精製等を容易に行なうための配列を用いることができ、例えば、FLAGタグ、ヘキサ-ヒスチジン・タグ、ヘマグルチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げるができる。

【0013】

本発明の機能的等価改変体は、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列の1又は複数の箇所において、1又は複数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～7個、更に好ましくは1～5個）、例えば、1～数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、SMG-1活性を示すポリペプチドである限り、特に限定されるものではなく、その起源もヒトに限定されない。

【0014】

例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列を有するポリペプチドのヒトにおける変異体が含まれるだけでなく、ヒト以外の生物（例えば、サル、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）由来の機能的等価改変体が含まれる。ヒト以外の生物由来の機能的等価改変体としては、後述の実施例5に示すように、サルの分子量400kDa又は430kDaの各天然ポリペプチド、ラットの分子量400kDa又は430kDaの各天然ポリペプチド、あるいは、マウスの分子量400kDa又は430kDaの各天然ポリペプチドを挙げるができる。

更には、それらの天然ポリペプチド（すなわち、ヒト由来の変異体、あるいは、ヒト以外の生物由来の機能的等価改変体）をコードするポリヌクレオチドを元にして、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを元にして、遺伝子工学的に人為的に改変したポリヌクレオチドを用いて製造したポリペプチドなどが含まれる。なお、本明細書において「変異体」（variation）とは、同一種内の同一ポリペプチドにみられる個体差、あるいは、数種間の相同ポリペプチドにみられる差異を意味する。

【0015】

配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列を有するポリペプチドのヒトにおける変異体、あるいは、ヒト以外の生物由来の機能的等価改変体は、当業者であれば、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列（例えば、配列番号1で表される塩基配列における第712番目～第11301番目の塩基からなる配列）の情報を基にして、取得することができる。なお、遺伝子組換え技術については、特に断りがない場合、公知の方法（例えば、Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989）に従って実施することが可能である。

【0016】

例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列の情報を基にして適当なプライマー又はプローブを設計し、前記プライマー又はプローブと、目的とする生物〔例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）〕由来の試料（例えば、総RNA若しくはmRNA画分、cDNAライブラリー、又はファージライブラリー）とを用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法（Saiki, R. K. ら, Science, 239, 487-491, 1988）又はハイブリダイゼーション法を実施することにより、ポリペプチドコードするポリヌクレオチドを取得し、そのポリヌクレオチドを適当な発現系を用いて発現させ、発現したポリペプチドが、例えば、実施例9（1）に記載の方法により、SMG-1活性を示すことを確認することにより、所望のポリペプチドを取得することができる。

【0017】

また、前記の遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドは、常法、例えば、部位特異的突然変異誘発法（site-specific mutagenesis; Mark, D. F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984）により、ポリペプチドをコードする

ポリヌクレオチドを取得し、そのポリヌクレオチドを適当な発現系を用いて発現させ、発現したポリペプチドが、例えば、実施例9(1)に記載の方法により、SMG-1活性を示すことを確認することにより、所望のポリペプチドを取得することができる。

【0018】

本発明の相同ポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列との相同性、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第107番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を含み、しかも、SMG-1活性を示すポリペプチドである限り、特に限定されるものではないが、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第107番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列に関して、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、更に好ましくは99%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含むことができる。本発明の相同ポリペプチドとしては、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第129番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列との相同性、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第1番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列との相同性、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第107番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列との相同性が90%以上（より好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上、特に好ましくは99%以上）であるアミノ酸配列を有し、しかも、SMG-1活性を示すポリペプチドが好ましい。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLAST (Basic local alignment search tool; Altschul, S. F. ら, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) により得られた値を意味する。

【0019】

更に、本発明のポリペプチドには、哺乳動物細胞又はその破砕物（例えば、細胞溶解物）と、SMG-1（好ましくは哺乳動物SMG-1、より好ましくはヒトSMG-1）に特異的に反応する抗体とを接触させることにより免疫複合体（例えば、免疫沈降物）を生成させ、前記抗体を除去することにより前記免疫複合体から分離して得られるポリペプチドが含まれる。このようなポリペプチドとしては、例えば、ヒト、サル、ラット、又はマウスの分子量400kDa又は430kDaの各天然ポリペプチドを挙げることができる。

【0020】

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである限り、特に限定されるものではなく、例えば、配列番号1で表される塩基配列における第712番目～第11301番目の塩基からなる配列を含むポリヌクレオチドを挙げることができ、

(i) 配列番号1で表される塩基配列における第646番目～第11301番目の塩基からなる配列を有するポリヌクレオチド〔本発明の前記ポリペプチド(1a)をコードする〕、あるいは、

(ii) 配列番号1で表される塩基配列における第328番目～第11301番目の塩基からなる配列を有するポリヌクレオチド〔本発明の前記ポリペプチド(1c)をコードする〕、又は

(iii) 配列番号1で表される塩基配列における第712番目～第11301番目の塩基からなる配列を有するポリヌクレオチド〔本発明の前記ポリペプチド(1e)をコードする〕

が好ましい。なお、本明細書における用語「ポリヌクレオチド」には、DNA及びRNAの両方が含まれる。

【0021】

本発明のポリヌクレオチドの製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、(1)PCRを用いた方法、(2)常法の遺伝子工学的手法（すなわち、cDNAライブラリーで形質転換した形質転換株から、所望のcDNAを含む形質転換株を選択する方法）を用いる方法、又は(3)化学合成法などを挙げるこ

とができる。以下、各製造方法について、順次、説明する。

【0022】

前記(1)のPCRを用いた方法では、例えば、以下の手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドを産生する能力を有するヒト細胞又は組織からmRNAを抽出する。次いで、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に基づいて、本発明のポリペプチドに相当するmRNAの全長を挟むことのできる2個1組のプライマーセット、あるいは、その一部のmRNA領域を挟むことのできる2個1組のプライマーセットを作成する。抽出した前記mRNAを鋳型とする逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を行なうことにより、本発明のポリペプチドの全長cDNA又はその一部を得ることができる。

【0023】

より詳細には、まず、本発明のポリペプチドの産生能力を有する細胞又は組織から、本発明のポリペプチドをコードするmRNAを含む総RNAを既知の方法により抽出する。抽出法としては、例えば、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法、又はグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法等を挙げることができるが、グアニジン・チオシアネート塩化セシウム法を用いることが好ましい。本発明のポリペプチドの産生能力を有する細胞又は組織は、例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド又はその一部を用いたノーザンブロットティング法、あるいは、本発明のポリペプチドに特異的な抗体を用いたウェスタンブロットティング法などにより特定することができる。

【0024】

続いて、抽出したmRNAを精製する。mRNAの精製は常法に従えばよく、例えば、mRNAをオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着後、溶出させることにより精製することができる。所望により、ショ糖密度勾配遠心法等によりmRNAを更に分画することもできる。また、mRNAを抽出しなくても、市販されている抽出精製済みのmRNAを用いることもできる。

次に、精製されたmRNAを、例えば、ランダムプライマー、オリゴdTプライマー、及び／又はカスタム合成したプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行ない、第1鎖cDNAを合成する。この合成は、常法によって行なうことができる。得られた第1鎖cDNAを用い、目的ポリヌクレオチドの全長又は一部の領域を挟んだ2種類のプライマーを用いてPCRを実施し、目的とするcDNAを増幅することができる。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、前記DNAを制限酵素等で切断し、接続することによって目的とするDNA断片を得ることもできる。

【0025】

前記(2)の常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、以下の手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

まず、前記のPCRを用いた方法で調製したmRNAを鋳型として、逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成した後、この1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成する。その方法としては、例えば、S1ヌクレアーゼ法(Efstathiadis, A. ら, Cell, 7, 279-288, 1976)、Land法(Land, H. ら, Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266, 1981)、O. Joon Yoo法(Yoo, O. J. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053, 1983)、又はOkayama-Berg法(Okayama, H. 及びBerg, P., Mol. Cell. Biol., 2, 161-170, 1982)などを挙げることができる。

【0026】

次に、前記2本鎖cDNAを含む組換えプラスミドを作製した後、大腸菌(例えば、DH5 α 株、HB101株、又はJM109株)に導入して形質転換させ、例えば、テトラサイクリン、アンピシリン、又はカナマイシン等に対する薬剤耐性を指標として、組換え体を選択する。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合には、Hanahanの方法(Hanahan, D. J., Mol. Biol., 166, 557-580, 1983)、すなわち、CaCl₂、MgCl₂、又はRbClを共存させて調製したコンピテント細胞に、前記組

換えDNA体を加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしては、プラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターを用いることもできる。

【0027】

このようにして得られる形質転換株から、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する方法としては、例えば、以下に示す(i)合成オリゴヌクレオチドプローブを用いる形質転換株スクリーニング法、(ii)PCRにより作製したプローブを用いる形質転換株スクリーニング法、(iii)本発明のポリペプチドに対する抗体を用いる形質転換株スクリーニング法、又は(iv)セレクトィブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーション系を用いる形質転換株スクリーニング法を採用することができる。

【0028】

前記(i)の合成オリゴヌクレオチドプローブを用いる形質転換株スクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドの全部又は一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブ(^{32}P 又は ^{33}P で標識する)として、形質転換株のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルター又はポリアミドフィルターとハイブリダイズさせ、得られた陽性株を検索して、これを選択する。なお、プローブ用のオリゴヌクレオチドを合成する場合には、コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列とすることもできるし、あるいは、考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数のヌクレオチド配列とすることもできる。後者の場合には、イノシンを含ませてその種類を減らすことができる。

【0029】

前記(ii)のPCRにより作製したプローブを用いる形質転換株スクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、本発明のポリペプチドの一部に対応するセンスプライマー及びアンチセンスプライマーの各オリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてPCR

を行ない、目的ポリペプチドの全部又は一部をコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる鋳型DNAとしては、本発明のポリペプチドを産生する細胞のmRNAより逆転写反応にて合成したcDNA、又はゲノムDNAを用いることができる。このようにして調製したDNA断片を、例えば、 ^{32}P 又は ^{33}P で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーション又はブランクハイブリダイゼーションを行なうことにより、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する。

【0030】

前記(iii)の本発明のポリペプチドに対する抗体を用いる形質転換株スクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、形質転換株の培養上清、細胞内、又は細胞表面にポリペプチドを産生させ、本発明のポリペプチドに対する抗体及び前記抗体に対する2次抗体を用いて、所望のポリペプチド産生株を検出し、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する。

【0031】

前記(iv)のセレクトティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーション系を用いる形質転換株スクリーニング法では、例えば、以下の手順により、目的のcDNAを有する形質転換株を選択することができる。

すなわち、形質転換株から得られるcDNAを、ニトロセルロースフィルター等にブロットし、本発明のポリペプチドの産生能力を有する細胞から別途調製したmRNAをハイブリダイズさせた後、cDNAに結合したmRNAを解離させ、回収する。回収されたmRNAを適当なポリペプチド翻訳系、例えば、アフリカツメガエルの卵母細胞へ注入したり、あるいは、ウサギ網状赤血球ライゼート又は小麦胚芽等の無細胞系を用いて、ポリペプチドに翻訳させる。本発明のポリペプチドに対する抗体を用いて検出して、目的のcDNAを有する形質転換株を選択する。

【0032】

得られた目的の形質転換株より本発明のポリヌクレオチドを採取する方法は、

公知の方法（例えば、Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989）に従って実施することができる。例えば、細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、得られたプラスミドDNAからcDNA領域を切り出すことにより行なうことができる。

【0033】

前記（3）の化学合成法を用いた方法では、例えば、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することによって、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。各DNAは、DNA合成機【例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman社製)、又は394 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems社製) など】を用いて合成することができる。

また、本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの情報に基づいて、例えば、ホスファイト・トリエステル法 (Hunkapiller, M. ら, Nature, 10, 105-111, 1984) 等の常法に従い、核酸の化学合成により製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンは、それ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば、利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、常法に従って決定することができる (Crantham, R. ら, Nucleic Acids Res., 9, r43-r74, 1981)。更に、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的突然変異誘発法 (site specific mutagenesis) (Mark, D. F. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666, 1984) 等により実施することができる。

【0034】

これまで述べた種々の方法により得られるDNAの配列決定は、例えば、マキシム・ギルバートの化学修飾法 (Maxam, A. M. 及びGilbert, W., "Methods in Enzymology", 65, 499-559

， 1 9 8 0) やジデオキシヌクレオチド鎖終結法 (M e s s i n g , J . 及び V i e i r a , J . , G e n e , 1 9 , 2 6 9 - 2 7 6 , 1 9 8 2) 等により行なうことができる。

【 0 0 3 5 】

単離された本発明のポリヌクレオチドを、適当なベクターDNAに再び組込むことにより、真核生物又は原核生物の宿主細胞をトランスフェクションすることができる。また、これらのベクターに適当なプロモーター及び形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞においてポリヌクレオチドを発現させることが可能である。

【 0 0 3 6 】

本発明の発現ベクターは、本発明のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、用いる宿主細胞に応じて適宜選択した公知の発現ベクターに、本発明のポリヌクレオチドを挿入することにより得られる発現ベクターを挙げることができる。

【 0 0 3 7 】

また、本発明の細胞も、本発明の前記発現ベクターでトランスフェクションされ、本発明のポリヌクレオチドを含む限り、特に限定されるものではなく、例えば、本発明のポリヌクレオチドが、宿主細胞の染色体に組み込まれた細胞であることもできるし、あるいは、本発明によるポリヌクレオチドを含む発現ベクターの形で含有する細胞であることもできる。また、本発明のポリペプチドを発現している細胞であることもできるし、あるいは、本発明のポリペプチドを発現していない細胞であることもできる。本発明の細胞は、例えば、本発明の発現ベクターにより、所望の宿主細胞をトランスフェクションすることにより得ることができる。

【 0 0 3 8 】

例えば、真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、及び酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えば、サルの細胞であるCOS細胞 (G l u z m a n , Y . , C e l l , 2 3 , 1 7 5 - 1 8 2 , 1 9 8 1) 、 チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (U r l a u b

, G. 及び Chasin, L. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980)、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞、前記HEK293細胞にエプスタイン・バーウイルスのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞 (Invitrogen社)、又はヒト由来細胞である293T細胞 (DuBridge, R. B. ら, Mol. Cell Biol., 7, 379-387, 1987) 等を挙げることができる。

【0039】

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写終結配列等を有するものを使用することができ、更に必要により、複製起点を有しているものも使用することができる。前記発現ベクターの例としては、例えば、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr (Subramani, S. ら, Mol. Cell Biol., 1, 854-864, 1981)、ヒトの延長因子プロモーターを有するpEF-BOS (Mizushima, S. 及び Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、又はサイトメガロウイルスプロモーターを有するpCEP4 (Invitrogen社) 等を挙げることができる。

【0040】

宿主細胞としてCOS細胞を用いる場合には、発現ベクターとしてSV40複製起点を有しているものを使用すれば、細胞内で自律増殖が可能である。更に、転写プロモーター、転写終結シグナル、及びRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、pME18S (Maruyama, K. 及び Takebe, Y., Med. Immunol., 20, 27-32, 1990)、pEF-BOS (Mizushima, S. 及び Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18, 5322, 1990)、又はpCDM8 (Seed, B., Nature, 329, 840-842, 1987) 等を挙げることができる。

【0041】

前記発現ベクターは、例えば、DEAE-デキストラン法 (Luthman,

H. 及びMagnusson, G., *Nucleic Acids Res.*, 11, 1295-1308, 1983)、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法 (Graham, F. L. 及びvan der Ed, A. J., *Virology*, 52, 456-457, 1973)、市販のトランスフェクション試薬 (例えば、FuGENETM6 Transfection Reagent; Boehringer Mannheim社製) を用いた方法、あるいは、電気パルス穿孔法 (Neumann, E. ら, *EMBO J.*, 1, 841-845, 1982) 等により、COS細胞に取り込ませることができる。

【0042】

更に、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現することのできるベクター、例えば、pRSVneo (Sambrook, J. ら, "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 又はpSV2-neo (Southern, P. J. 及びBerg, P., *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 327-341, 1982) 等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより、本発明のポリペプチドを安定に産生するトランスフェクションされた細胞を得ることができる。

【0043】

本発明の細胞は、常法に従って培養することができ、前記培養により細胞内に本発明のポリペプチドが生産される。前記培養に用いることのできる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種の培地を適宜選択することができる。例えば、COS細胞の場合には、例えば、RPMI-1640培地又はダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地に、必要に応じて牛胎仔血清 (FBS) 等の血清成分を添加した培地を使用することができる。また、293-EBNA細胞の場合には、牛胎仔血清 (FBS) 等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地 (DMEM) 等の培地にG418を加えた培地を使用することができる。

【0044】

本発明の細胞を培養することにより、前記細胞の細胞内に生産される本発明のポリペプチドは、前記ポリペプチドの物理的性質や生化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、分離精製することができる。具体的には、本発明のポリペプチドを含む細胞抽出液を、例えば、通常のタンパク質沈殿剤による処理、限外濾過、各種液体クロマトグラフィー〔例えば、分子ふるいクロマトグラフィー（ゲル濾過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、又は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等〕、若しくは透析法、又はこれらの組合せ等により、本発明のポリペプチドを精製することができる。

【0045】

本発明のポリペプチドは、マーカー配列とインフレームで融合して発現させることにより、本発明のポリペプチドの発現の確認、又は精製等が容易になる。前記マーカー配列としては、例えば、FLAGタグ、ヘキサ-ヒスチジン・タグ、ハマグチニン・タグ、又はmycエピトープなどを挙げることができる。また、マーカー配列と本発明のポリペプチドとの間に、プロテアーゼ（例えば、エンテロキナーゼ、ファクターXa、又はトロンピンなど）が認識する特異的なアミノ酸配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去することが可能である。

【0046】

本発明のポリペプチドを用いると、本発明のポリペプチドのSMG-1活性を阻害する物質をスクリーニングすることができる。本発明のポリペプチドのSMG-1活性を阻害する物質は、ナンセンス変異により早期転写終止コドン（premature translation termination codon: PTC）を生じることが原因で生じる病態の治療剤の候補物質として有用であり、本発明のポリペプチドそれ自体を、本発明のポリペプチドのSMG-1活性を阻害する物質、あるいは、特定遺伝子のナンセンス変異による病態の治療剤のスクリーニングツールとして使用することができる。ナンセンス変異によりPTCを生じることが原因で生じる病態としては、特に限定されるものではないが

、例えば、遺伝性疾患（例えば、デセンヌ型筋ジストロフィー症）、あるいは、体細胞変異によって生じる癌などを挙げることができる。重要な点は、ゲノムの変異によって生じる全ての疾患の中で、「ナンセンス変異によりPTCを生じる」場合のほとんどがこれに当てはまるという点である。

【0047】

ゲノムの変異により生ずる疾患の1/4は、特定遺伝子の途中に終始コドンが存在するため、前記遺伝子が本来コードする全長ポリペプチドからなるタンパク質が発現されないばかりでなく、NMD機構の存在により、前記遺伝子が本来コードする全長ポリペプチドのN末端側部分断片からなるタンパク質断片も、ほとんど発現されないことが、その原因とされている。しかし、遺伝子の途中に終始コドンが存在したとしても、遺伝子の種類又は終始コドンの位置によっては、タンパク質断片の状態でも、全長ポリペプチドと同程度の、あるいは、最小限必要な活性を有する場合も少なくない。この場合、NMD機構を抑制することができれば、有効な活性を有するタンパク質断片の発現が可能となるため、特定遺伝子の途中に終始コドンが存在するために生じる病態、すなわち、特定遺伝子のナンセンス変異による病態の少なくとも一部を解消することができることが理論的に予測されている。しかし、従来、NMDを特異的に抑制する手法は、全く知られていない。

本発明のスクリーニング方法により選択された物質は、本発明のポリペプチドのSMG-1活性の阻害を通じて、NMDを特異的に抑制することができ、従って、特定遺伝子のナンセンス変異によるあらゆる病態について、少なくとも一部について遺伝子変異を解消することができるという全く新しいタイプの治療剤の有効成分として有用である。

【0048】

本発明のスクリーニング方法は、

(1) 本発明のポリペプチドと、(2) Upf1/SMG-2（例えば、ヒトUpf1/SMG-2）と、(3) 試験化合物とを接触させる工程、及び本発明のポリペプチドとUpf1/SMG-2と試験化合物とを接触させた状態で、リン酸化反応を実施し、Upf1/SMG-2がリン酸化されたか否かを分

析する工程

を含む。

【0049】

本発明のスクリーニング方法にかけることのできる試験化合物としては、特に限定されるものではないが、例えば、ケミカルファイルに登録されている種々の公知化合物（ペプチドを含む）、コンビナトリアル・ケミストリー技術（Terrett, N. K. ら, Tetrahedron, 51, 8135-8137, 1995）又は通常の合成技術によって得られた化合物群、あるいは、ファージ・ディスプレイ法（Felici, F. ら, J. Mol. Biol., 222, 301-310, 1991）などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清、植物若しくは海洋生物由来の天然成分、又は動物組織抽出物などもスクリーニングの試験化合物として用いることができる。更には、本発明のスクリーニング方法により選択された化合物（ペプチドを含む）を、化学的又は生物学的に修飾した化合物（ペプチドを含む）を用いることができる。

【0050】

本発明のスクリーニング方法においては、試験ポリペプチドとUpf1/SMG-2とを接触させる代わりに、本発明のポリペプチドとUpf1/SMG-2と試験化合物とを接触させること以外は、先述のSMG-1活性の判定方法と同様にして実施することができる。すなわち、本発明のポリペプチドとUpf1/SMG-2と試験化合物とを接触させ、前記試験化合物の存在下においてリン酸化反応を実施し、Upf1/SMG-2がリン酸化されたか否かを分析することにより、前記試験化合物が、本発明のポリペプチドのSMG-1活性を阻害する物質であるか否かを判定することができる。試験化合物の存在下において、Upf1/SMG-2がリン酸化されないか、あるいは、前記リン酸化の程度が減少する場合には、前記試験化合物が、本発明のポリペプチドのSMG-1活性を阻害する物質であると判定することができる。

【0051】

本発明のポリペプチドに反応する抗体（例えば、ポリクローナル抗体又はモノ

クローナル抗体)は、各種動物に、本発明のポリペプチド、又はその断片を直接投与することで得ることができる。また、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入したプラスミドを用いて、DNAワクチン法(Raz, E. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9519-9523, 1994; 又はDonnelly, J. J. ら, J. Infect. Dis., 173, 314-320, 1996)によっても得ることができる。

【0052】

ポリクローナル抗体は、例えば、本発明のポリペプチド又はその断片を適当なアジュバント(例えば、フロイント完全アジュバントなど)に乳濁した乳濁液を、腹腔、皮下、又は静脈等に免疫して感作した動物(例えば、ウサギ、ラット、ヤギ、又はニワトリ等)の血清又は卵から製造することができる。このように製造された血清又は卵から、常法のポリペプチド単離精製法によりポリクローナル抗体を分離精製することができる。そのような分離精製方法としては、例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、又はDEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、若しくはプロテインAアガロース等によるクロマトグラフィー法を挙げることができる。

【0053】

モノクローナル抗体は、例えば、ケーラーとミルスタインの細胞融合法(Köhler, G. 及びMilstein, C., Nature, 256, 495-497, 1975)により、当業者が容易に製造することが可能である。

すなわち、本発明のポリペプチド又はその断片を適当なアジュバント(例えば、フロイント完全アジュバントなど)に乳濁した乳濁液を、数週間おきにマウスの腹腔、皮下、又は静脈に数回繰り返し接種することにより免疫する。最終免疫後、脾臓細胞を取り出し、ミエローマ細胞と融合してハイブリドーマを作製する。

【0054】

ハイブリドーマを得るためのミエローマ細胞としては、例えば、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損又はチミジンキナーゼ欠損のようなマーカーを有するミエローマ細胞(例えば、マウスミエローマ細胞株

P3X63Ag8, U1)を利用することができる。また、融合剤としては、例えば、ポリエチレングリコールを利用することができる。更には、ハイブリドーマ作製における培地として、例えば、イーグル氏最小必須培地、ダルベッコ氏変法最小必須培地、又はRPMI-1640などの通常よく用いられている培地に、10～30%のウシ胎仔血清を適宜加えて用いることができる。融合株は、HAT選択法により選択することができる。ハイブリドーマのスクリーニングは培養上清を用い、ELISA法又は免疫組織染色法などの周知の方法により行ない、目的の抗体を分泌しているハイブリドーマのクローンを選択することができる。また、限界希釈法によってサブクローニングを繰り返すことにより、ハイブリドーマの単クローン性を保証することができる。このようにして得られるハイブリドーマは、培地中で2～4日間、あるいは、プリスタンで前処理したBALB/c系マウスの腹腔内で10～20日間培養することで、精製可能な量の抗体を産生することができる。

【0055】

このように製造されたモノクローナル抗体は、培養上清又は腹水から常法のポリペプチド単離精製法により分離精製することができる。そのような分離精製方法としては、例えば、遠心分離、透析、硫酸アンモニウムによる塩析、又はDEAE-セルロース、ハイドロキシアパタイト、若しくはプロテインAアガロース等によるクロマトグラフィー法を挙げることができる。

また、モノクローナル抗体又はその一部分を含む抗体断片は、前記モノクローナル抗体をコードする遺伝子の全部又は一部を発現ベクターに組み込み、適当な宿主細胞（例えば、大腸菌、酵母、又は動物細胞）に導入して生産させることもできる。

【0056】

以上のように分離精製された抗体（ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を含む）について、常法により、ポリペプチド分解酵素（例えば、ペプシン又はパパイン等）によって消化を行ない、引き続き、常法のポリペプチド単離精製法により分離精製することで、活性のある抗体の一部分を含む抗体断片、例えば、 $F(ab')_2$ 、Fab、Fab'、又はFvを得ることができる。

【0057】

更には、本発明のポリペプチドに反応する抗体を、クラクソンらの方法又はゼベデらの方法 (Clackson, T. ら, Nature, 352, 624-628, 1991; 又は Zebedee, S. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3175-3179, 1992) により、一本鎖 (single chain) Fv 又は Fab として得ることも可能である。また、マウスの抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に置き換えたトランスジェニックマウス (Lonberg, N. ら, Nature, 368, 856-859, 1994) に免疫することで、ヒト抗体を得ることも可能である。

【0058】

【実施例】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】

《ヒト SMG-1 (hSMG-1) cDNA のクローニング》

本発明者は、ヒト cDNA クローン KIAA0421 [Ishikawa K ら, DNA Res., 4, 307 (1997); GenBank アクセス番号 AB007881] のコードするアミノ酸配列の N 末端は、PIKK ファミリーで保存されているキナーゼドメインに特徴的なアミノ酸配列と相同性があり、また、その C 末端は、PIKK ファミリーで保存されている FAT ドメイン [Bosotti ら, Trends Biochem. Sci., 25, 225 (2000)] に特徴的なアミノ酸配列と相同性があることを発見した。従って、ヒト cDNA クローン KIAA0421 は、新規な PIKK ファミリーの cDNA と考えられたが、その塩基配列には、終止コドン及び 3' 非翻訳領域は存在するものの、開始コドンと特定することができる配列はなく、不完全長 cDNA であると考えられた。そこで、cDNA 全長の塩基配列を明らかにするために、クローン KIAA0421 よりも更に 5' 側の cDNA クローンの取得を試みた。

【0059】

ヒト cDNA クローン KIAA0421 の cDNA 断片をプローブとして、ヒ

ト細胞株HeLaのcDNAライブラリー（クローンテック社）からクローンCを単離した。同様に、HeLaのcDNAライブラリー [Chambonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 (14), 5310-5314] からクローンyama9 (Y9) を、ヒト肝臓ライブラリー（クローンテック社）からクローンliver33 (Liv33) を、そして、ヒト筋肉ライブラリー（クローンテック社）からクローンmuscle29 (mus29) をそれぞれ単離し、更に、それ以外にも種々のクローンを単離し、各々の塩基配列を決定した。

【0060】

続いて、配列番号3で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと、配列4で表される塩基配列からなるリバースプライマーとの組み合わせを使用し、ヒト細胞株HeLaの総RNAを用いる逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法により、クローンgap1を取得した。前記RT-PCRは、市販のキット (Ready-To-Go RT-PCR beads; Pharmacia社) を使用し、42℃で30分間のRT反応を実施した後、95℃ (3分間) で熱変性を行ない、95℃ (1分間) と54℃ (1分間) と72℃ (1分間) とからなるサイクルを32回繰り返す、最後に72℃ (7分間) の伸張反応を行なうことによりPCRを実施した。

また、配列番号5で表される塩基配列からなるフォワードプライマーと、配列番号6で表される塩基配列からなるリバースプライマーとの組み合わせを使用し、ヒト細胞株HeLaの総RNAを用いるRT-PCR法により、クローンgap2を取得した。前記RT-PCRは、クローンgap1を取得する際の前記RT-PCRと同じ条件で実施した。

これらのクローンの塩基配列をつなげてみたが、まだ開始コドンと特定することができない配列はなく、不完全長なcDNAの塩基配列しか得られなかった。

【0061】

そこで、得られた塩基配列と一致する配列を有するESTを、塩基配列データベース (GenBank) から検索したところ、ヒトESTクローンAI005513 [リサーチ・ジェネティクス (Research Genetics) 社

］が見出された。このESTの塩基配列には、フレーム中に開始コドンATGが存在したため、ヒトcDNAクローンKIAA0421とその上流領域とからなる全長cDNAの開始コドンを含む領域のESTと推定した。

このヒトESTクローンAI005513の塩基配列を決めることによって、ヒトcDNAクローンKIAA0421とその上流領域とからなるcDNAの塩基配列を明らかにした。その塩基配列は、配列表の配列番号1で表される塩基配列であり、塩基配列データベース (GenBank) で検索したところ、この塩基配列は新規であった。

【0062】

得られた各cDNAクローンと、それから得られた新規塩基配列及びオープンリーディングフレーム (ORF) との関係を、図1に示す。前記各cDNAクローンから得られたKIAA0421とその上流領域とからなるcDNAの長さは、約13kbであり、3657アミノ酸からなるタンパク質をコードする約11kbのオープンリーディングフレーム (ORF) が存在していた。前記ORFでコードされるタンパク質の推定分子量は約430kDaであり、後述の実施例5(1)で検出した内在性分子 (p430) の概算分子量と一致した。

【0063】

ORFがコードするアミノ酸配列 (配列番号2で表されるアミノ酸配列) について相同性検索をしたところ、PIKKファミリーであるFRAP (FKBP12-rapamycin associated protein) /mTOR (mammalian target of rapamycin) /RAFT1 (rapamycin and FKBP-target 1)、ATM (ataxia telangiectasia mutated)、ATR (ATM- and Rad3-related) /FRAP1、及びDNA-PKcs (DNA-PK catalytic subunit) 等と相同性があった。ヒトSMG-1と公知タンパク質とを比較した結果を図2に示す。

【0064】

図2において、推定されるPIKK関連ドメインを、黒色の四角形で示す。FKBP12/ラバマイシン結合領域 (FRB) 及びその相同性領域 (FRBH)

を濃灰色で示し、そして、RAD3相同性領域を明灰色で示す。CR1～CR6は、線虫SMG1 (CeSMG1) と相同性の高い領域を意味し、「1000a.a.」はアミノ酸1000残基の長さを示す。また、相同性の数値は、GeneWorks ver2.5.1 (IntelliGenetics社) による。GenBankアクセス番号は、FRAPがL34075であり、ATMがU33841であり、ATRがU76308であり、DNA-PKcsがU34994である。

【0065】

ヒトSMG-1において、前記CR1は、第557番目～第727番目のアミノ酸からなる領域であり、以下、同様に、前記CR2は第911番目～第1051番目のアミノ酸からなる領域、前記CR3は第1560番目～第1756番目のアミノ酸からなる領域、前記CR4は第1785番目～第2107番目のアミノ酸からなる領域、前記CR5は第2141番目～第2422番目のアミノ酸からなる領域、そして、前記CR6は第3602番目～第3657番目のアミノ酸からなる領域である。

また、ヒトSMG-1における第2130番目～第2136番目のアミノ酸からなる領域は、NLS (nuclear localization signal) として機能しうるアミノ酸配列である。

【0066】

また、得られた新規配列とこれらのPIKKファミリー分子について、アミノ酸配列に基づき分子系統樹を作成したところ、異常RNAの分解に関与する遺伝子であるショウジョウバエSMG-1及び線虫SMG-1と最も近い分子であり、ヒトcDNAクローンKIAA0421とその上流領域とからなるcDNAは、ヒトのSMG-1をコードするものと推定された。なお、ヒトSMG-1には、FRAP/mTOR/RAFT1のFKBP12/ラパマイシン結合部位と相同性を有する配列FRBH (FKBP12/rapamycin binding homology) が存在し、また、他のPIKKファミリーと異なり、キナーゼドメインとFATドメインとの間に約1200アミノ酸の長い配列が挿入されていた。

【0067】

【実施例2】

《ノーザンブロット法による各種ヒトセルラインにおけるヒトSMG-1のmRNAの検出》

ヒト細胞株HPB-ALL [Morikawa, S. ら, Int. J. Cancer, 21, 166 (1978)]、HL-60 (CCL-240)、U937 [Sundstrom, C. ら, Int. J. Cancer, 17, 565 (1976)]、HepG2 (HB-8065)、HeLa (CCL-2)、PC3、A498、及び5873Tから、RNA抽出キット (Quick Prep Total RNA抽出キット; アマシャム・ファルマシア・バイオテク社) を用いて、キット付属のマニュアルに従い、総RNAを調製した。以下のブロッキング及びハイブリダイズは、文献 [Sugiyama, JBC, 275, 1095-1104, (2000)] に従って実施した。すなわち、各RNAを電気泳動した後、ポリアミド膜 (Hybond; アマシャム・ファルマシア・バイオテク社) に転写した。ヒトSMG-1のcDNAクローンKIAA0421の5' 側断片 (配列番号1で表される塩基配列における第6255番目~第7048番目の塩基からなる配列に相当) を、マルチプライムDNA標識システム (Multiprime DNA Labelling System; アマシャム・ファルマシア・バイオテク社) を用いて、付属のマニュアルに従い、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{dCTP}$ (220TBq/mmol; アマシャム・ファルマシア・バイオテク社) を用いて標識した。RNAを転写したポリアミド膜に、標識したcDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせた後、 $0.1\times\text{SSC}$ [1.67mmol/L 塩化ナトリウム及び 1.67mmol/L クエン酸ナトリウム (pH 7.0)] - 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いて、 60°C での洗浄操作 (30分間) を3回繰り返し、シグナルをオートラジオグラフィーで検出した。

【0068】

HPB-ALL、U937、HepG2、HeLa、及びPC3について、オートラジオグラフィーの結果を図3に示す。図3において、「28S」及び「1

8S」は、28SリボソームRNA及び18SリボソームRNAの泳動位置をそれぞれ示す。図3に示すように、矢印で示す2本のヒトSMG-1のmRNAのバンドが検出された。また、データは示していないが、残る全てのヒト細胞株（A549及び293T）で、同様の2本のバンドが検出された。従って、ヒトSMG-1遺伝子からは2種類の長さのmRNAが転写されと考えられた。

【0069】

【実施例3】

《蛍光イン・サイチュ・ハイブリダイゼーション (fluorescent in situ hybridization; FISH) 法によるヒト染色体のマッピング》

FISHマッピングは、文献 [Izumiら, JCB, 143, 95-106 (1998)] に従って実施した。すなわち、ヒト血液より単離したリンパ球を、10%仔ウシ血清とフィトヘマグルチニンとを加えた培地MEM (Minimal Essential Medium) を用いて、37℃で68～72時間培養した。細胞周期を同調させて培養したリンパ球に、0.18mg/mLブロモデオキシウリジン (BrdU; シグマ・アルドリッチ社) を添加して細胞に取り込ませた。無血清培地で3回洗浄した後、2.5mg/mLチミジン (シグマ・アルドリッチ社) を含むMEMを用いて、37℃で6時間再培養した。細胞を回収し、低浸透圧処理、固定化、及び風乾による標準的な方法により、スライドを作成した。

【0070】

FISHのプロープとして、ヒトSMG-1のcDNAクローンKIAA0421 (全長) を、ビオチン化dATP及びバイオニック標識キット (BioNick Labelling Kit; ライフ・テクノロジーズ社) を用いて、15℃で1時間の反応により、ビオチン化した [Heng HHら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 9509-9513 (1992)] 。イン・サイチュ・ハイブリダイゼーション及びその検出は、文献 [Heng HHら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 9509 (1992); Heng HH及びTsui LC, Chromosoma, 102

、325(1993)]の方法に従った。簡単に述べると、スライドを55℃で1時間熱し、リボヌクレアーゼ処理をした後、スライドを70%ホルムアルデヒドを含む2×SSC[33.3mmol/L塩化ナトリウム及び33.3mmol/Lクエン酸ナトリウム(pH7.0)]を用いて、70℃で2分間処理して染色体を変性させ、エタノールで脱水した。プローブを変性染色体のスライド上に載せ、終夜でプローブとハイブリダイゼーションした後、スライドを洗浄し、検出系に供した。第16番染色体上にシグナルが見られ、ヒトSMG-1遺伝子は第16番染色体(16p12)上にあることが判明した。

【0071】

【実施例4】

《ヒトSMG-1に対する抗体の作製》

抗ヒトSMG-1抗血清P1、抗血清C3、抗血清L1、抗血清L2、抗血清N1、及び抗血清N2を、以下に示す免疫原をアジュバントと共に用いて、ウサギ(New Zealand White)を免疫することにより作製した。前記アジュバントとして、抗血清LT及び抗血清NTでは、タイター・マックス・ゴールド(Titer Max Gold; CytRx社)を使用し、抗血清LT及び抗血清NT以外の抗血清では、フロイントアジュバント(和光純薬工業)を使用した。

【0072】

抗血清P1は、キーホール・リンペット・ヘモシアニン(keyhole limpet hemocyanin; KLH)と結合させた、ヒトSMG-1のC末端に相当する15アミノ酸ペプチドを免疫源とした。前記ペプチドは、配列番号7で表されるアミノ酸配列(CDNLAQLYEGWTAWV)、すなわち、配列番号2で表されるアミノ酸配列の第3644番目～第3657番目のアミノ酸残基からなる配列のN末端に、システイン残基を付加した配列を有する。

抗血清C3の作製のため、まず、クローンKIAA0421のヒトSMG-1のcDNAの1.4kbのMscI-MscI断片(配列番号1で表される塩基配列における第7641番目～第9186番目の塩基からなる配列に相当し、キナーゼ挿入領域のC末端側半分をカバーする)を、グルタチオンS-トランスフ

ェラーゼ (glutathione S-transferase; GST) との融合タンパク質発現用ベクター pGEX6P-3 (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社) の Sma I 部位に挿入したプラスミドで、大腸菌 BL21 を形質転換し、ヒト SMG-1 の C 末断片 [ヒト SMG-1 のアミノ酸配列 (配列番号 2 で表されるアミノ酸配列) における第 3076 番目～第 3542 番目のアミノ酸残基からなる配列に相当] を GST との融合タンパク質 (分子量=約 70 kDa) として発現させた。大腸菌内で生産された融合タンパク質は、不溶性の封入体を形成した。精製した封入体を 1×SDS サンプルバッファー [100 mmol/L-TrisHCl (pH 6.8)、2% SDS、6% β-メルカプトエタノール (β-ME)、10% グリセロール、及び 0.01% プロモフェノールブルー] で溶解し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を実施した後、70 kDa のタンパク質のバンドをゲルから切り出して、細かく砕き、免疫源として使用した。

【0073】

抗血清 C3 の作製の場合と同様に、抗血清 L1 及び抗血清 L2 の作製のため、クローン Liver33 の約 600 bp の cDNA 断片 (配列番号 1 で表される塩基配列における第 2917 番目～第 3505 番目の塩基からなる配列に相当) を切り出し、GST との融合タンパク質発現ベクター pGEX6P-1 (アマシャム・ファルマシア・バイオテク社) に挿入したプラスミドで、大腸菌 BL21 を形質転換し、ヒト SMG-1 の断片 (配列番号 2 で表されるアミノ酸配列の第 864 番目～第 1059 番目のアミノ酸残基からなる配列に相当) を GST との融合タンパク質 (分子量=約 50 kDa) として発現させた。大腸菌内で生産されたこの融合タンパク質も不溶性だったので、抗血清 C3 の免疫源の調製の場合と同様にして、免疫源を調製した。

【0074】

抗血清 N1 及び抗血清 N2 の作製のため、クローン AI005513 由来の約 0.7 kbp の Sma I-HincII 断片 (配列番号 1 で表される塩基配列における第 306 番目～第 645 番目の塩基からなる配列に相当) を、GST との融合タンパク質発現ベクター pGEX-6P (アマシャム・ファルマシア・バイオ

テク社)に挿入した。生成された組換えタンパク質を、標準的なグルタチオンビーズ法により大腸菌から精製し、免疫源として使用した。

図4に各抗原部位を模式的に示す。図4において、線虫SMG-1と相同性の高い領域(図2におけるCR1~CR6)を灰色又は黒色の四角形で示す。また、図4において、「FRBH」は、FKBP12/ラパマイシン結合部位と相同性を有する配列(FKBP12/rapamycin binding homology)を意味し、「PIKK」は、フォスファチジルイノシトールキナーゼ(PIK)-関連キナーゼを意味し、「PIKK-C」は、PIKK触媒領域カルボキシル末端部分を意味する。また、各一文字記号「N」、「L」、「C」、及び「P」は、それぞれ、抗血清N1及び抗血清N2、抗血清L1及び抗血清L2、抗血清C3、並びに抗血清P1を作製するのに用いた各抗原部位を示す。

【0075】

【実施例5】

《各種動物細胞又は各種動物組織におけるSMG-1タンパク質の検出》

(1) 各種動物細胞溶解物におけるウェスタンブロット法によるSMG-1タンパク質の検出

HeLa細胞を7%仔ウシ血清を含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)により培養し、細胞を溶解用緩衝液F[20mmol/L-Tris-HCl(pH7.5)、0.25mmol/Lショ糖、1.2mmol/L-EGTA、20mmol/L-β-メルカプトエタノール、1mmol/Lオルトバナジン酸ナトリウム、1mmol/Lピロリン酸ナトリウム、1mmol/Lフッ化ナトリウム、1%トリトン(Triton)X-100、0.5%ノニデット(Nonidet)P-40、150mmol/L-NaCl、1mmol/L-PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)、10μg/mLロイペプチン、及び2μg/mLアプロチニン]中で超音波破碎し、細胞溶解物を調製した。

【0076】

同様に、ヒト、サル、マウス、及びラット由来の種々のセルラインについても、各種動物細胞溶解物を調製した。具体的には、ヒトセルラインとしては、He

La (ATCC:CCL-2)、293 (ATCC:CCL1573)、Hep G2 (ATCC:HB-8065)、Jurkat [Schneider, U. ら, Int. J. Cancer, 19, 621-626 (1977)]、U937 [Sundstrom, C. ら, Int. J. Cancer, 17, 565 (1976)]、HL-60 [Collins, S. J. ら, Nature, 270, 347 (1977)]、及びHPB-ALL [Morikawa, S. ら, Int. J. Cancer, 21, 166 (1978)]を使用し、サルセルラインとしては、COS1 (ATCC:CRL1650)を使用し、マウスセルラインとしては、NIH3T3 (ATCC:CRL1658)、C3H10T1/2 (ATCC:CCL226)、及びC2C12を使用し、ラットセルラインとしては、3Y1 [Samdineyer, S. ら, Cancer Res., 41, 830 (1981)]及びL6 [Yaffe, D. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 61, 477-483 (1968)]を使用した。

【0077】

得られた各種動物細胞溶解物（タンパク質20pg分に相当）を、5.5%及び12.5%の各ゲル濃度で、それぞれSDS-PAGEを行なった後、抗血清P1、抗血清C3、抗血清L1、抗血清L2、抗血清N1、及び抗血清N2、並びにコントロール用の免疫前血清を用いて、それぞれウエスタンブロット法を実施した。

HeLa細胞溶解物について、抗血清P1、抗血清C3、抗血清L2、及び抗血清N1を用いた場合の結果を図5に示し、各種動物細胞溶解物について、抗血清P1及び抗血清C3を用いた場合の結果を図6に示す。

図5及び図6において、記号「WB」は、ウエスタンブロット法を意味する。図5において、記号「pre」は、免疫前血清を意味する。図6において、「WB:C3」列又は「WB:P1」列における上側の各矢印は、p430を示し、「WB:C3」列又は「WB:P1」列における下側の各矢印は、p400を示す。

【0078】

抗血清N1及び抗血清N2を除く全ての抗血清において、400kDa及び430kDaの2つのタンパク質のバンドを抗血清特異的に検出した。以下、分子量400kDaのSMG-1タンパク質をp400と称し、分子量430kDaのSMG-1タンパク質をp430と称することがある。また、マウス由来の2種の細胞株NIH3T3及びC3H10T1/2においては、400kDa及び430kDaの2本のバンドの他に、460kDaのタンパク質のバンドも検出された。

一方、抗血清N1及び抗血清N2では、430kDaのバンドしか検出されなかった。従って、400kDaのバンドは、ヒトSMG-1のN末端部分が欠失しているSMG-1分子と考えられる。

この仮説を検証するために、前記hSMG-1 cDNAのヌクレオチド配列を綿密に調査したところ、コザック (Kozak) の翻訳開始基準を満たすメチオニン (Met) コドンが129番目の位置に存在することが明らかになった。129番目のMetから開始するその推定ORFは、3529アミノ酸からなる396,040Daのタンパク質である。従って、おそらくp400が、129位の第2のメチオニンから開始するORFの生成物であると考えられる。

【0079】

(2) 各種動物組織由来の細胞溶解物におけるウェスタンブロット法によるSMG-1タンパク質の検出

ラット及びマウス由来の種々の組織において、抗血清C3を用いてウェスタンブロット法を行なった。各動物から手術によって組織を摘出し、それらを液体窒素中で急速に凍結した後、押しつぶすことにより粉末化した。1×SDSサンプルバッファー中で可溶化した後に、各組織からのタンパク質20μgを用いてウェスタンブロット法を実施した。

【0080】

結果を図7に示す。図7において、記号「WB」はウェスタンブロット法を意味し、上側の矢印はp430を示し、下側の矢印は、p400を示す。ラット組織としては、心臓 (heart)、大脳 (cerebrum)、小脳 (cerebellum)、肺 (lung)、肝臓 (liver)、骨格筋 (sk. mus

cle)、腎臓(kidney)、脾臓(spleen)、胸腺(thymus)、前立腺(prostate)、卵巣(testis)、及び大腸(ovary)を使用し、マウス組織としては、胎盤(placenta)を使用した。

全ての組織で、400kDaのタンパク質(p400)及び430kDaのタンパク質(p430)の2本のバンドが検出された。なお、マウス胎盤においては、400kDa及び430kDaの2本のバンドの他に、460kDaのタンパク質のバンドも検出されたが、460kDaのバンドは非特異的シグナルであった。

【0081】

【実施例6】

《ヒトSMG-1(ヒトHeLa細胞溶解物の抗ヒトSMG-1抗血清による免疫沈降物)のプロテインキナーゼ活性の確認》

(1) ヒトHeLa細胞溶解物の各種ヒトSMG-1抗血清による免疫沈降物における、ウェスタンブロット法によるSMG-1タンパク質の検出

前記実施例5(1)と同様にして得られたHeLa細胞溶解物について、抗血清N1、抗血清L2、及び抗血清C3並びにコントロール用の免疫前抗血清を用いて、それぞれ免疫沈降を行なった。免疫沈降は、細胞溶解物に各抗血清を添加し、4℃で2時間放置して免疫複合体を形成させた後、プロテインAセファロースCL-4B(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社)を添加して更に2時間放置して免疫複合体を結合させ、遠心分離によりプロテインAセファロースCL-4Bを回収する方法で行なった。各免疫沈降物について、5.5%の各ゲル濃度でSDS-PAGEを行ない、抗血清C3を用いたウェスタンブロット法を行なった。

【0082】

結果を図8に示す。図8において、記号「WB」は、ウェスタンブロット法を意味し、記号「³²P」は、後述の実施例6(2)におけるオートラジオグラフィの結果であることを示す。また、記号「pre」は、免疫前血清を意味し、記号「IP」は、免疫沈降物を意味する。更に、「³²P」列における上側の矢印は、p430を示し、「³²P」列における下側の矢印は、p400を示す。

図8の「WB : C3」列に示すように、抗血清L2又は抗血清C3の免疫沈降物からは、抗血清C3によって400 kDaと430 kDaの二つのタンパク質バンドが検出されたのに対して、抗血清N1の免疫沈降物からは、抗血清C3によって430 kDaのタンパク質バンドのみが検出された。

【0083】

(2) ヒトHeLa細胞溶解物の各種ヒトSMG-1抗血清による免疫沈降物のプロテインキナーゼ活性の確認

前記実施例6(1)で得られた各免疫沈降物を、0.25 mol/L-LiClを含む溶解用緩衝液Fで5回洗浄した後、1×キナーゼ反应用緩衝液[10 mmol/L-HEPES-KOH (pH 7.5)、50 mmol/L-β-グリセロリン酸、50 mmol/L-NaCl、1 mmol/Lジチオスレイトール(DTT)、及び10 mmol/L-MnCl₂]で2回洗浄した。

洗浄後の免疫沈降物に、2×キナーゼ反应用緩衝液(すなわち、前記組成の2倍濃度のキナーゼ反应用緩衝液) 25 μLを加えた。リン酸化反応は、10 mmol/L-ATP及び370 kBq [γ -³²P] ATP (6000 Ci/mmol; アマシャム・ファルマシア・バイオテク社)を等量(25 μL)加えることで開始し、時々攪拌しながら、30℃で30分間反応させた。最終反応量を50 μLに維持し、4×SDSサンプルバッファー25 μLを加えて反応を終了させた。5.5%及び12.5%の各ゲル濃度でSDS-PAGEを行なった後、オートラジオグラフィによりリン酸化されたタンパク質を検出した。タンパク質のリン酸化強度は、イメージアナライザーBAS2000(富士写真フィルム)で測定した。

【0084】

結果を図8に示す。図8の「³²P」列に示すように、抗血清L2又は抗血清C3の免疫沈降物において、分子量430 kDa及び400 kDaのリン酸化タンパク質が検出された。分子量430 kDa及び400 kDaの各タンパク質は、ヒトSMG-1と考えられるので、ヒトSMG-1は自己リン酸化することが判明した。

【0085】

【実施例7】

《ヒトSMG-1タンパク質断片の融合タンパク質及びその一アミノ酸置換変異体の発現》

本実施例では、(1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列における第107番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列からなるヒトSMG-1タンパク質部分断片と、配列番号8で表されるアミノ酸配列[連続するヒスチジン(His)残基6個を含む]からなるHisタグとの融合タンパク質(以下、「6H-hSMG-1」と称する)、及び(2) 前記6H-hSMG-1において、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第2331番目のアスパラギン酸(D)に相当するアスパラギン酸が、アラニン(A)に置換されているキナーゼ不完全置換体(以下、「6H-hSMG-1(DA)」と称する)をそれぞれ発現するための発現ベクターを調製した。

【0086】

(1) ヒトSMG-1タンパク質断片とHisタグとの融合タンパク質(6H-hSMG-1)発現用ベクターの構築

6H-hSMG-1の発現用ベクターは、以下の手順で実施した。

すなわち、hSMG-1のcDNA全長の一部(配列番号2で表されるアミノ酸配列における第107番目～第3657番目のアミノ酸からなる配列に相当する部分)を含む前記cDNAクローンを、制限酵素HpaI及びXhoIで消化した後、11kbpのDNA断片を精製した。前記DNA断片を、発現ベクターSR6H[マルチクローニングサイト(MCS)の上流に、Hisタグをコードする塩基配列を有する改変SRDベクター]のSmaI/XhoI部位に導入することにより、組換えヒトSMG-1の発現用ベクターSR6H-hSMG-1を得た。

【0087】

(2) 6H-hSMG-1の一アミノ酸置換変異体[6H-hSMG-1(DA)]発現用ベクターの構築

続いて、前記発現用ベクターSR6H-hSMG-1と、市販のキット(カメレオンミュータジェネシスキット; ストラタジーン社)とを用いて、6H-hS

MG-1 (DA) の発現用ベクターSR6H-hSMG-1 (DA) を得た。

【0088】

(3) 6H-hSMG-1及び6H-hSMG-1 (DA) の発現とイン・ビトロ
ロプロテインキナーゼ活性の確認

293T細胞を、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM; GibcoBRL社) を用いて培養した後、前記実施例7 (1) で調製した発現ベクターSR6H-hSMG-1、あるいは、前記実施例7 (2) で調製した発現ベクターSR6H-hSMG-1 (DA) を用いてトランスフェクションした。なお、コントロールとして、ベクターSR6Hを用いたトランスフェクションも実施した。トランスフェクションから2日間経過後に、細胞を回収し、溶解用緩衝液Fを用いて、細胞を溶解した。

抗ポリヒスチジン抗体 (His-Tag; Novagen社) を用いること以外は、前記実施例6 (1) に記載の手順に従って、前記の各細胞溶解液の免疫沈降を実施し、得られた各免疫沈降物について、前記実施例6 (2) に記載の手順に従って、プロテインキナーゼ活性の測定を実施した。また、前記免疫沈降により得られた各免疫沈降物のウェスタンブロット法も実施した。

【0089】

結果を図9に示す。図9において、記号「WB: anti-His」は、抗ポリヒスチジン抗体によるウェスタンブロット法の結果であることを示し、記号「³²P」は、オートラジオグラフィーの結果であることを示す。また、記号「vector」は、ベクターSR6H (コントロール) を用いた場合の結果を意味し、記号「hSMG-1 WT」は、ベクターSR6H-hSMG-1を用いた場合の結果を意味し、記号「hSMG-1 DA」は、ベクターSR6H-hSMG-1 (DA) を用いた場合の結果を意味する。更に、「³²P」列における矢印は、6H-hSMG-1を示す。

図9に示すように、6H-hSMG-1及び6H-hSMG-1 (DA) のいずれも、抗ポリヒスチジン抗体によって免疫沈降した。また、配列番号2で表されるアミノ酸配列における第2331番目のアスパラギン酸に相当する、hSMG-1中のアスパラギン酸 (ATRにおいて、キナーゼ活性に必須であることが

公知である第2475番目のアスパラギン酸に相当する)が、前記キナーゼ活性に必要なことが示された。図9に示すように、免疫沈降により得られた6H-h SMG-1は、約400kDaの移動度を示し、固有のキナーゼ活性を有する。これらの結果は、6H-h SMG-1が、固有の自己リン酸化 (autophosphorylation) 活性を有することを明確に示している。

【0090】

【実施例8】

〈SMG-1が β グロブリンmRNAのPTC依存性分解に関与していることの確認〉

(1) レポーター遺伝子プラスミドの構築

線虫 (*C. elegans*) において、7種類のsmg遺伝子がNMDに関与することが確認されている。我々は、PIKKファミリーの新規メンバーが線虫 (*C. elegans*) SMG-1に対して全体配列類似性を示すという予期せぬ発見をしたことにより、h SMG-1が哺乳動物のNMDに関与するか否かを調査することにした。この目的のために、ヒト β グロブリン (BGG) の39番目のコドンにおけるPTCが存在するか又は不在の遺伝子配列をそのCMVプロモーターの下流に配置したレポーター遺伝子 (図10) を以下の手順で構築した。この構築において、前記CMVプロモーターは、上流のテトラサイクリン応答因子 (TRE: tetracycline-responsive element) 配列の制御下にあり、また、プラスミドpTet OFFを有するセルライン中に導入される場合には、このレポーター遺伝子からの転写は、テトラサイクリン又はその誘導体 (ドキシサイクリン) の存在下において特異的に、且つ迅速に停止させられる。図10において、エキソン (exon) は、四角形で示し、イントロン (intron) は、直線で示す。

【0091】

レポーター遺伝子プラスミドpTRE BGG WT (すなわち、BGGの39番目のコドンにおけるPTCが不在) を作成するために、ヒト β グロブリン遺伝子断片を、ヒト遺伝子ライブラリー (クローンテック社) からPCRによって増幅し、そして、pTREベクター (クローンテック社) に挿入した。また、コ

ドン39におけるヒト β グロブリン遺伝子のナンセンス変異を標準的な手順により誘発して、レポーター遺伝子プラスミドpTRE BGG PTC（すなわち、BGGの39番目のコドンにおけるPTCが存在）を生成した。

【0092】

(2) レポーターmRNA蓄積量のノーザンブロット法による評価

前記実施例8(1)で調製したレポータープラスミドBGG-WT又はレポータープラスミドBGG-39PTCを、内部標準としてのCATプラスミドと一緒に、細胞株HeLa Tet-OFF（クローンテック社）又は細胞株MEF Tet-OFF（クローンテック社）中に同時にトランスフェクトさせ、そして、ドキシサイクリン不在下でインキュベートした後に、前記BGGのmRNAの蓄積をノーザンブロット法によって評価した。

具体的には、トランスフェクション用試薬として、細胞株HeLa Tet-OFFの場合にはポリフェクチン（QIAGEN社）を使用し、細胞株MEF Tet-OFFの場合にはエフェクチン（effectin）（QIAGEN社）を使用した。トランスフェクションして24時間経過後に、10cm皿6個に再び細胞を蒔き、ドキシサイクリン不在下で更に24時間培養した。ドキシサイクリン50ng/mLを添加することにより前記レポーターからの転写を停止させてから、0時間、0.5時間、1時間、又は3時間の時点で細胞を回収し、そして、総RNAを単離した。等量（2 μ g）の各細胞からのBGGmRNA及びCATmRNAの存在量を、BGGプローブ及びCATプローブをそれぞれ用いるノーザンブロット法によって評価した。

【0093】

結果を図11に示す。図11において、記号「WT」は、レポータープラスミドBGG-WTを用いた場合の結果を意味し、記号「39PTC」は、レポータープラスミドBGG-39PTCを用いた場合の結果を意味する。また、記号「BG」は、BGGプローブにより得られた結果を意味し、記号「CAT」は、CATプローブにより得られた結果を意味する。

図11に示すように、どちらの細胞株においても、BGG-WT（すなわち、PTCを含まないBGG）のmRNAの蓄積は、BGG-39PTC（すなわち

、39位にPTCを含むBGG)の蓄積よりも豊富であった。

【0094】

(3) 6H-hSMG-1及び6H-hSMG-1(DA)のレポーター-mRNA蓄積に与える影響の確認

トランスフェクションの際に、更に、前記実施例7(1)で調製した発現ベクターSR6H-hSMG-1、あるいは、前記実施例7(2)で調製した発現ベクターSR6H-hSMG-1(DA)のいずれかを同時にトランスフェクションさせること以外は、前記実施例8(2)の操作を繰り返した。

HeLa Tet-OFF細胞におけるBGG-39PTCに関する結果を図12及び図13に示す。図12及び図13において、記号「vector」又は「vec」は、ベクターSR6H(コントロール)を用いた場合の結果を意味し、記号「hSMG-1 WT」又は「WT」は、ベクターSR6H-hSMG-1を用いた場合の結果を意味し、記号「hSMG-1 DA」又は「DA」は、ベクターSR6H-hSMG-1(DA)を用いた場合の結果を意味する。また、記号「BG」は、BGGプローブにより得られた結果を意味し、記号「CAT」は、CATプローブにより得られた結果を意味する。更に、記号「39PTC」は、レポータープラスミドBGG-39PTCを用いた場合の結果を意味する。

6H-hSMG-1(DA)が過剰に発現すると、BGG-39PTC転写生成物の蓄積が増幅されることになるのに対して、6H-hSMG-1が過剰に発現すると、ベクターSR6H(コントロール)を導入した場合と比較して、BGG-39PTCをコードする安定状態量のmRNAが減少することになる。これらの結果は、hSMG-1及びその固有のプロテインキナーゼ活性がBGGのmRNAのPTC依存性崩壊に関連することを支持する強力な証拠を提供している。

【0095】

次に、前記の考えを更に確認するために、BGG WT又はBGG-39PTCのmRNA種の半減期における6H-hSMG-1又は6H-hSMG-1(DA)の過剰な発現の影響を試験した。ドキシサイクリンを培養器に添加するこ

とによって前記BGGレポーターのどちらの転写も停止し、そして、規定の時間（0時間、0.5時間、1時間、1.5時間、2時間、及び3時間）が経過した後に細胞を収穫してBGGのmRNAの量を測定した。

【0096】

結果を図14～図17に示す。図14～図17において、記号「BGG WT」は、レポータープラスミドBGG-WTを用いた場合の結果を意味し、記号「BGG PTC」は、レポータープラスミドBGG-39PTCを用いた場合の結果を意味する。また、記号「vector」又は「vec」は、ベクターSR6H（コントロール）を用いた場合の結果を意味し、記号「hSMG-1 WT」又は「WT」は、ベクターSR6H-hSMG-1を用いた場合の結果を意味し、記号「hSMG-1 DA」又は「DA」は、ベクターSR6H-hSMG-1（DA）を用いた場合の結果を意味する。更に、記号「Dox.」は、ドキシサイクリンを意味し、記号「BG」は、BGGを意味し、記号「18S」は、18SリボソームRNAを意味する。

BGG WTの半減期は、既に報告されているように、非常に長いように見え[Sun, X. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 10009-10014 (1998)]、また、6H-hSMG-1又は6H-hSMG-1（DA）のいずれの発現によっても影響されていない。一方、BGG-39PTCの半減期は、6H-hSMG-1の過剰な発現によって大きく短縮され、6H-hSMG-1（DA）の過剰な発現によって長くなる。これらの結果を前記の結果と組み合わせると、6H-hSMG-1がPTC依存性のBGG mRNAの崩壊に関連していることが明確に示されている。更に、これらの結果は、6H-hSMG-1の前記キナーゼ活性が、哺乳動物のNMDにおいて重要な役割を果たしていることも示している。

【0097】

【実施例9】

《イン・ピトロにおける6H-hSMG-1によるhUPF1/SMG-2のリン酸化》

Perlickによる実験 [Perlick, H. A. ら, Proc. Nat

1. Acad. Sci. USA, 93, 10928-10932 (1996)] は、hUpf1 (酵母Upf1のヒト相同体) を同定し、そして、そのヘリカーゼドメインの点突然変異を用いることによって、Sunらは、hUpf1が哺乳動物のNMDに関連していることを示した [Sun, X. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 10009-10014 (1998)]。より近年においては、Andersonが、線虫 (C. elegans) SMG-2タンパク質がUpf1の線虫 (C. elegans) における相同体であることを確認している [Pageら, Mol. Cell. Biol., 19, 5943-5951 (1999)]。SMG-2は、リン酸化タンパク質であり、そして、非常に重要なことに、その他の6種類のsmg遺伝子は、SMG-2のリン酸化状態におけるそれらの突然変異の影響に基づいて2つの群に分類することができる。smg-1、smg-2、及びsmg-3突然変異体においては、リン酸化形態のSMG-2は検出されなかった。smg-5、smg-6、及びsmg-7突然変異体においては、リン酸化したSMG-2が高レベルで蓄積された。

【0098】

(1) 全長hUpf1/SMG-2融合タンパク質の6H-hSMG-1によるリン酸化の確認

hSMG-1がhUpf1/SMG-2を直接リン酸化する可能性を試験するために、HAタグを付加したhUpf1/SMG-2 (以下、HA-hUpf1/SMG-2と称する) を293T細胞中で発現させ、そして、HA-hUpf1/SMG-2を精製した。

具体的には、まず、HA-hUpf1/SMG-2を発現させるための発現ベクターは、以下の手順で作成した。すなわち、SRベクター [Hirai, S. ら, Oncogene, 12, 641-650 (1996)] を改変して、マルチクローニングサイト (MCS) 及びその上流にHAタグを挿入することにより、ベクターSRHAIを得た。得られたベクターSRHAIのMCSに、hUpf1/SMG-2の全長をコードするcDNAを挿入することにより、発現ベクターSRHAI-hUpf1/SMG-2を得た。より具体的には、ベクターS

RHAI を制限酵素 Bgl II で切断後、平滑末端化したものに、cDNA クローン KIAA0221 を制限酵素 Xho I 及び B1p I で切断後、平滑末端化したものを挿入した。

【0099】

得られた発現ベクター SRHAI-hUpf1/SMG-2 で、293T 細胞をトランスフェクションした。トランスフェクションの2日後に細胞を回収し、溶解用緩衝液 F 中に溶解した。抗 HA アフィニティビーズ (ロッシュ社) を溶解物に加えた。1 時間後に、そのビーズを溶解用緩衝液 F により 3 回洗浄し、そして、洗浄緩衝液 [20 mmol/L-Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 mol/L-NaCl、0.1 mmol/L-EDTA、及び 0.05% Tween 20] で 3 回洗浄した。得られた洗浄物を、HA ペプチド (YPYDVPDYA) 1 mg/mL を含む洗浄緩衝液中で 37℃ で処理することにより、結合タンパク質を溶離した。次に、10% グリセロール及び 1 mmol/L-DTT を含む 1×PBS に対して透析することにより、HA-hUpf1/SMG-2 を得た。

【0100】

一方、前記実施例 7 (1) で調製した発現ベクター SR6H-hSMG-1、あるいは、前記実施例 7 (2) で調製した発現ベクター SR6H-hSMG-1 (DA) でトランスフェクトした cDNA トランスフェクト 293T 細胞から、前記実施例 7 (3) に記載の手順に従って、6H-hSMG-1 及び 6H-hSMG-1 (DA) もそれぞれ精製した。

リン酸化反応は、基質として、前記実施例 9 (1) で調製した HA-hUpf1/SMG-2 を 2×キナーゼ反应用緩衝液に加えること以外は、前記実施例 6 (2) に記載の手順に従って実施した。

【0101】

結果を図 18 に示す。図 18 において、記号「vector」は、ベクター SR6H (コントロール) を用いた場合の結果を意味し、記号「hSMG-1 WT」は、ベクター SR6H-hSMG-1 を用いた場合の結果を意味し、記号「hSMG-1 DA」は、ベクター SR6H-hSMG-1 (DA) を用いた場

合の結果を意味する。記号「anti-His」は、抗ポリヒスチジン抗体によるウエスタンブロット法の結果であることを意味し、記号「 ^{32}P 」は、オートラジオグラフィーの結果であることを意味し、記号「CBB」は、クーマシーブリリアントブルー（CBB）染色による結果であることを意味する。

図18に示すように、精製した6H-hSMG-1は、HA-hUpf1/SMG-2をリン酸化しており、このことは、少なくとも精製物を用いた系において、hUpf1/SMG-2がhSMG-1の直接基質となることを示唆している。PIKKファミリーに属するキナーゼは、SQ又はTQモチーフ [Kim, S. T. ら, J. Biol. Chem., 274, 37538-37543 (1999)] 中のセリン又はトレオニン残基をリン酸化する。興味深いことに、hUpf1/SMG-2は、そのC末端領域に、SQモチーフの繰返しを含有する [Pageら, Mol. Cell. Biol., 19, 5943-5951 (1999)]。hSMG-1がPIKKファミリーに属するキナーゼをコードすることと併せて考えると、このことは、SQモチーフがhSMG-1の標的であることを示唆している。

【0102】

(2) hUpf1/SMG-2部分断片の融合タンパク質における6H-hSMG-1によるリン酸化の確認(1)

前記仮説を確認するために、断片化したhUpf1/SMG-2を含むマルトース結合タンパク質 (maltose binding protein; MBP) 融合タンパク質シリーズを構築し、それらを精製した。

具体的には、hUpf1/SMG-2をコードするcDNAを含むSRHA I-hUpf1/SMG-2 [前記実施例9(1)で調製したもの] から、それぞれ切り出した3種類のcDNA断片、すなわち、N末端側部分断片をコードするcDNA断片 (1.4 kbp, BgIII-Eco47III断片, hUpf1/SMG-2の第1番目~第462番目のアミノ酸からなる配列に相当)、中間領域の部分断片をコードするcDNA断片 (1.0 kbp, Eco47IH-Eco47II断片, hUpf1/SMG-2の第463番目~第800番目のアミノ酸からなる配列に相当)、及びC末端側部分断片をコードするcDNA断片

(1.4 kbp, Eco4711I-BstZ17I断片, hUpf1/SMG-2の第801番目~第1118番目のアミノ酸からなる配列に相当)を、pMaI-c2ベクター(New England Biolabs)中に挿入して、それぞれ、発現ベクターpMBP-hSMG-2 N、発現ベクターpMBP-hSMG-2 M、及び発現ベクターpMBP-hSMG-2 Cを得た。

【0103】

得られたこれらのMBP融合タンパク質は、いずれも大腸菌内で非常に難溶性であったので、組換えタンパク質は、以下の通りに封入体から精製した。すなわち、回収した細胞を、 $2\mu\text{g/mL}$ アプロチニン、 $10\mu\text{g/mL}$ ロイペプチン、 2mmol/L -PMSF、及び 50mmol/L ベンズアミジンを加えた超音波破碎緩衝液 [50mmol/L -TrisHCl (pH8.0)、 50mmol/L -NaCl、 1mmol/L -EDTA、 1mmol/L -DTT、及び1%トリトンX-100]中に懸濁し、そして、超音波破碎した。 $10000\times g$ で遠心して得られた沈殿物(封入体が多い)を洗浄溶液(0.5%トリトンX-100及び 1mmol/L -EDTA)中で5回洗浄した。洗浄後の沈殿物を変性緩衝液 [8mol/L 尿素、 50mmol/L -TrisHCl (pH8.0)、 1mmol/L -DTT、及び 1mmol/L -EDTA]中に懸濁し、そして室温で1時間放置した。 $10000\times g$ で遠心して得られた上清を、尿素 4mol/L を含む変性緩衝液で1時間透析し、続いて、尿素 2mol/L を含む変性緩衝液で1時間透析し、そして、超音波破碎緩衝液で一晩、透析処理した。この処理で再構造化(renaturation)したMBP融合タンパク質を回収し、アミロース樹脂(New England Biolabs)を用いて、添付のマニュアルに従って、各MBP融合タンパク質、すなわち、hUpf1/SMG-2のN末端側部分断片、中間領域の部分断片、又はC末端側部分断片とMBPとの融合タンパク質を精製した。

【0104】

リン酸化反応は、基質として、前記の各MBP融合タンパク質を2×キナーゼ反応用緩衝液に加えること、そして、hSMG-1として、前記実施例7(3)に記載の手順に従って調製した6H-hSMG-1を使用すること以外は、前記

実施例6(2)に記載の手順に従って実施した。

結果を図19及び図20に示す。図20において、記号「CBB」は、CBB染色による結果であることを意味し、記号「 ^{32}P 」は、オートラジオグラフィーの結果であることを意味する。また、オートラジオグラムの下に示す各数字は、pMBP-hSMG-2 CとMBPとの融合タンパク質におけるオートラジオグラムの強度を100とした場合の相対値である。

図20に示すように、hUpf1/SMG-2のC末端側断片及びN末端側断片は、それぞれ、hSMG-1の良好な基質としての役割を果たした。hUpf1/SMG-2のC末端側断片がリン酸化された結果は、Pageらの前記報告(すなわち、hUpf1/SMG-2は、そのC末端領域に、SQモチーフの繰り返しを含有する)を考えると、SQモチーフをリン酸化していることを予測させる。また、hUpf1/SMG-2のN末端側断片がリン酸化された結果から、N末端領域にも複数のSQモチーフが存在しており、その部位がリン酸化された可能性が考えられる。

【0105】

(3) hUpf1/SMG-2部分断片の融合タンパク質における6H-hSMG-1によるリン酸化の確認(2)

次に、前記の点をより明確にするために、GST融合タンパク質の別のシリーズを製造した。ここでは、hUpf1/SMG-2における各SQ又はTQ推定モチーフとその周囲の12アミノ酸残基とからなる各14merペプチドを、GSTの下流に融合した融合タンパク質を製造した。

具体的には、T28(すなわち、hUpf1/SMG-2における第28番目のトレオニン)、T325(すなわち、第325番目のトレオニン)、S474(すなわち、第474番目のセリン)、S681(すなわち、第681番目のセリン)、S1078(すなわち、第1078番目のセリン)、又はS1096(すなわち、第1096番目のセリン)を含む14merペプチドをそれぞれコードする各DNA、あるいは、p53タンパク質におけるS15(p53タンパク質における第15番目のセリン)を含む14merペプチド(コントロール)をコードするDNAを、それぞれ、ベクターpGEX 6P(アマシャムファルマ

シアバイオテック社)中に挿入することにより、各発現ベクターを調製し、前記発現ベクターでトランスフォームした大腸菌から、標準的グルタチオンビーズ法によりGST融合タンパク質を精製した。

【0106】

各14merペプチドのアミノ酸配列を図21に示す。図21において、記号「T28」は、T28を含む14merペプチドとGSTとの融合タンパク質における14merペプチド部分のアミノ酸配列を意味し、以下、同様に、記号「T325」、記号「S474」、記号「S681」、記号「S1078」、及び記号「S1096」は、それぞれ、T325、S474、S681、S1078、及びS1096を含む各14merペプチドとGSTとの融合タンパク質における14merペプチド部分のアミノ酸配列を意味し、記号「p53 S15」は、p53タンパク質におけるS15を含む14merペプチド(コントロール)とGSTとの融合タンパク質における14merペプチド部分のアミノ酸配列を意味する。

【0107】

リン酸化反応は、基質として、前記の各GST融合タンパク質を2×キナーゼ反应用緩衝液に加えること、そして、hSMG-1として、前記実施例7(3)に記載の手順に従って調製した6H-hSMG-1を使用すること以外は、前記実施例6(2)に記載の手順に従って実施した。

結果を図22に示す。図22において、記号「T28」は、T28を含む14merペプチドとGSTとの融合タンパク質を意味し、以下、同様に、記号「T325」、記号「S474」、記号「S681」、記号「S1078」、及び記号「S1096」は、それぞれ、T325、S474、S681、S1078、及びS1096を含む各14merペプチドとGSTとの融合タンパク質を意味し、記号「p53 S15」は、p53タンパク質におけるS15を含む14merペプチド(コントロール)とGSTとの融合タンパク質を意味する。記号「S1078A」は、前記「S1078」において、第1078番目のセリンをアラニンに置換した点変異体を意味する。また、記号「CBB」は、CBB染色による結果であることを意味し、記号「³²P」は、オートラジオグラフィーの結果

であることを意味する。また、オートラジオグラムの下に示す各数字は、p53タンパク質におけるS15を含む14merペプチドとGSTとの融合タンパク質(p53 S15)におけるオートラジオグラムの強度を100とした場合の相対値である。

【0108】

図22に示すように、p53タンパク質中のSQモチーフをコードするコントロール構築物は、6H-hSMG-1によってリン酸化された。更に、S1078を含むGST融合タンパク質、あるいは、S1096を含むGST融合タンパク質[以下、hUpf1/SMG-2融合タンパク質(S1096)と称する]は、6H-hSMG-1によって能率的にリン酸化された。これらの結果は、6H-hSMG-1は、少なくともイン・ビトロにおいては、hUpf1/SMG-2のSQモチーフであるS1078及びS1096におけるセリン残基をリン酸化することを確立している。

【0109】

【実施例10】

〈細胞内でのSMG-1によるhUpf1/SMG-2リン酸化の確認〉

前記実施例9で得られた結果(すなわち、6H-hSMG-1がhUpf1/SMG-2をイン・ビトロでリン酸化するという結果)を、線虫(*C. elegans*) smg遺伝子における結果と併せて考えると、hSMG-1はイン・ビボでもhUpf1/SMG-2をリン酸化し、そして、このリン酸化はNMDにおいて本質的な役割を果たすという或る興味ある可能性が持ち上がる。この可能性を評価するための第一段階として、次に、イン・ビボにおけるhUpf1/SMG-2のリン酸化を試験した。

【0110】

種々濃度のオカダ酸(OA;カルピオケム社)でHeLa細胞を4.5時間処理した後、細胞を回収し、1×SDSサンプルバッファー中に溶解した。6%SDS-PAGEを実施した後、抗hUpf1/SMG-2抗体を用いるウェスタブロット法によって、hUpf1/SMG-2の移動度シフト(mobility shift)を決定した。

結果を図23に示す。ホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸(OA)でHeLa細胞を処理すると、結果として、上方にシフトしたhUpf1/SMG-2のバンドが現れる。図23において、シフトしたバンドの位置に記号「*」を付した。また、図23における記号「anti-hUPF1/SMG-2」は、抗hUpf1/SMG-2抗体を用いるウエスタンブロット法により得られた結果であることを意味する。

【0111】

OAが誘発するhUpf1/SMG-2の上方シフトが、リン酸化によって発生することを示すため、免疫精製したhUpf1/SMG-2をアルカリホスファターゼで処理し、そして、SDS-PAGEにおけるその移動度を以下の通りに試験した。

すなわち、50nmol/Lオカダ酸存在下又は不在下(すなわち、培地のみ)で4.5時間処理したHeLa細胞を回収し、そして、1μmol/Lマイクロシスチン(microcystin)LR(カルピオケム社)及び10nmol/Lオカダ酸を含有する溶解用緩衝液F中に溶解し、続いて、抗hUpf1/SMG-2血清を用いて免疫沈降した。なお、マイクロシスチン及びオカダ酸を溶解用緩衝液Fに添加した理由は、一度リン酸化されたタンパク質が免疫沈降の操作の際に脱リン酸化されるのを防ぐためである。

溶解用緩衝液F及び脱リン酸化緩衝液[50mmol/L-Tris-HCl(pH9.0)及び1mmol/L-MgCl₂]中で洗浄した後、その免疫沈降物を脱リン酸化緩衝液50μLで懸濁した。仔ウシ小腸アルカリフォスファターゼ(CIAP;宝酒造)を0ユニット(すなわち、非添加)又は60ユニット添加して、反応を開始した。37℃で1時間インキュベートした後に、SDSサンプルバッファーを加えることで反応を停止した。6%SDS-PAGEを実施し、続いて、抗Upf1/SMG-2抗体を用いたウエスタンブロット法によりhUpf1/SMG-2の移動度シフトを決定した。

【0112】

結果を図24に示す。図24において、記号「OA」は、オカダ酸処理した細胞に由来する免疫沈降物を用いた場合の結果を意味し、記号「medium」は

、オカダ酸不在下の細胞に由来する免疫沈降物を用いた場合の結果を意味する。また、記号「anti-hUPF1/SMG-2」は、抗hUpf1/SMG-2抗体を用いるウエスタンブロット法により得られた結果であることを意味する。更に、記号「hUPF1-P」は、リン酸化されたhUpf1/SMG-2を意味し、記号「hUPF1」は、リン酸化されていないhUpf1/SMG-2を意味する。

上方に移動したバンドは、免疫沈降物をホスファターゼ(CIAP)で処理した場合に消え、このことは、OA処理により発生するhUpf1/SMG-2の前記上方シフトが、リン酸化であることを示している。

【0113】

次に、過剰に発現したhUpf1/SMG-2の分析のため、前記実施例9(1)で調製したHA-hUpf1/SMG-2発現用ベクターSRHA1-hUpf1/SMG-2と、前記実施例7(1)で調製した発現ベクターSR6H-hSMG-1又はベクターSR6H-hSMG-1(DA)とで、293T細胞をトランスフェクションした。50nmol/Lオカダ酸の存在下又は不在下で、細胞を4時間培養した。細胞を回収し、そして、1×SDSサンプルバッファ中に溶解した。抗HA抗体(12CA5;ペーリンガー社)を用いるウエスタンブロット法により、hUpf1/SMG-2の移動度シフトを決定した。

【0114】

結果を図25に示す。図25において、記号「vector」は、ベクターSR6H(コントロール)を用いた場合の結果を意味し、記号「hSMG-1 WT」は、ベクターSR6H-hSMG-1を用いた場合の結果を意味し、記号「hSMG-1 DA」は、ベクターSR6H-hSMG-1(DA)を用いた場合の結果を意味する。また、記号「anti-His」は、抗ポリヒスチジン抗体によるウエスタンブロット法の結果であることを意味する。更に、記号「HA hUPF1-P」は、リン酸化されたHA-hUpf1/SMG-2を意味し、記号「HA hUPF1」は、リン酸化されていないHA-hUpf1/SMG-2を意味する。図25において、シフトしたHA-hUpf1/SMG-2の位置に記号「*」を付した。

ベクターSR6H（コントロール）のみの場合と同様に、6H-hSMG-1（DA）を過剰に発現させた場合には、外因性のHAタグ付加hUpf1/SMG-2のOA誘発上方シフトは、観察されなかった。しかし、6H-hSMG-1が過剰に発現すると、HAタグ付加hUpf1/SMG-2のOA誘発上方シフトが大きく増幅された。

【0115】

【実施例11】

《6H-hSMG-1のプロテインキナーゼ活性を指標とした阻害剤の同定》

PIKKファミリーにおける過去の研究により、キナーゼのこのファミリーにおいて作用する阻害剤が同定されている。同定された阻害剤としては、例えば、ウォートマンニン[Sarkaria, S. N. ら, Cancer Res., 58, 4375-4382 (1998)]及びカフェイン[Sarkaria, S. N. ら, Cancer Res., 59, 4375-4382 (1999)]を挙げることができる。次に、哺乳動物のNMDにおけるhSMG-1の役割を評価するため、そして、細胞を薬理学的に操作することによるNMDの特異的な阻害の潜在的な戦略を評価するために、内因性基質として、前記実施例9（3）で調製したhUpf1/SMG-2融合タンパク質（S1096）[すなわち、第1096番目のセリン（S1096）を含む14merペプチドを、GSTの下流に融合した融合タンパク質]を用いることにより、hSMG-1のキナーゼ活性におけるこれらの阻害剤の効果を評価した。

具体的には、前記実施例7（3）に記載の手順に従って、6H-hSMG-1を調製した。図26及び図27に示す種々の濃度のウォートマンニン又はカフェインの存在下で、基質として、前記実施例9（3）で調製したhUpf1/SMG-2融合タンパク質（S1096）を用いて、イン・ビトロキナーゼアッセイを実施した。すなわち、リン酸化は、前記hUpf1/SMG-2融合タンパク質（S1096）とウォートマンニン又はカフェインとを2×キナーゼ反应用緩衝液に加えること、そして、hSMG-1として、前記実施例7（3）に記載の手順に従って調製した6H-hSMG-1を使用すること以外は、前記実施例6（2）に記載の手順に従って実施した。

【0116】

ウォートマンニンを用いた場合の結果を図26に、カフェインを用いた場合の結果を図27にそれぞれ示す。図26及び図27に示すように、ウォートマンニン及びカフェインの両方とも、それぞれ、約60nmol/L及び0.3mmol/LのIC50値で、6H-hSMG-1のキナーゼ活性を阻害した。一方、精製した組換えFKBP12の存在下において、ラパマイシンは、hSMG-1を阻害しなかった（データ記載せず）。

【0117】

【実施例12】

《SMG-1阻害剤がhUpf1/SMG-2のリン酸化を細胞内で抑制することの確認》

また、前記の2種のhSMG-1阻害剤の効果は、HeLa細胞中における内因性hUpf1/SMG-2のリン酸化においても試験することができる。

図28に示す種々の濃度のウォートマンニン、カフェイン、又はラパマイシンの存在下又は不在下で、HeLa細胞を30分間、前処理した。続いて、各薬剤の存在下で、50nmol/Lオカダ酸の存在下又は不在下で、前記細胞を4.5時間処理した。細胞溶解物を調製し、抗Upf1/SMG-2抗体を用いるウェスタンブロット法により分析した。

結果を図28に示す。図28において、記号「anti-hUPF1/SMG-2」は、抗hUpf1/SMG-2抗体を用いるウェスタンブロット法により得られた結果であることを意味する。また、記号「cont.」、記号「wort.」、記号「caff.」、及び記号「rap.」は、それぞれ、コントロール（すなわち、ウォートマンニン、カフェイン、及びラパマイシンの不在下）の結果、ウォートマンニン存在下の結果、カフェイン存在下の結果、及びラパマイシン存在下の結果であることを示す。更に、記号「hUPF1-P」は、リン酸化されたhUpf1/SMG-2を意味し、記号「hUPF1」は、リン酸化されていないhUpf1/SMG-2を意味する。

図28に示すように、ウォートマンニン及びカフェインは、両方とも、HeLa細胞中のhUpf1/SMG-2の上方シフトを阻害するが、ラパマイシンは

阻害しなかった。このことは、精製した系における結果（すなわち、前記実施例11の結果）と一致している。

【0118】

【実施例13】

《SMG-1阻害剤による内因性のPTC mRNAの安定化》

（1）SMG-1阻害剤による内因性のPTC含有BGG遺伝子産物の安定化》

h SMG-1が哺乳動物のNMDにおいて重要な役割を果たすならば、これらのh SMG-1阻害剤は、NMDを阻害するはずである。このことを試験するために、最初に、前記実施例8（1）で調製したレポータープラスミドBGG-WT又はレポータープラスミドBGG-39PTCを利用するレポーターBGG系を適用した。

具体的には、レポータープラスミドBGG-WT又はレポータープラスミドBGG-39PTCを、MEF-Tet OFF細胞にトランスフェクションし、そして、8枚の皿に再び蒔いた。50 ng/ml ドキシサイクリンの存在下で、図29に示す種々濃度のカフェイン（caff.）、ウォートマンニン（wort.）、ラバマイシン（rap.）、又はシクロヘキサミド（CHX）で細胞を4.5時間処理した。

【0119】

BGGプローブを用いるノーザンブロット法により総RNAを分析した結果を図29に示す。図29において、記号「BG WT」は、レポータープラスミドBGG-WTを用いた場合の結果を意味し、記号「BG PTC」は、レポータープラスミドBGG-39PTCを用いた場合の結果を意味し、記号「GAPDH」は、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼのcDNAをプローブとした場合の結果を意味する。また、記号「cont.」、記号「caff.」、記号「wort.」、記号「rap.」、及び記号「CHX」は、それぞれ、コントロール（すなわち、ウォートマンニン、カフェイン、ラバマイシン、及びシクロヘキサミドの不在下）の結果、カフェイン存在下の結果、ウォートマンニン存在下の結果、ラバマイシン存在下の結果、及びシクロヘキサミド存在下の結果であることを示す。

図29に示すように、タンパク質合成阻害剤であるCHXは、NMDを阻害し、そして、BGG-39PTC mRNA (BGG WTではなく) が蓄積され、このことは、これまでの観察と一致している。重要なことに、前記hSMG-1阻害剤、すなわち、カフェイン及びウオートマンニンは、結果として、BGG-39PTCを蓄積した。このことにより、hSMG-1が哺乳動物のNMDに関連することを支持する薬理学的証拠が得られた。

【0120】

(2) SMG-1阻害剤による内因性のPTC p.53遺伝子産物の安定化》

NMDは、PTC mRNAから生じる潜在的毒性タンパク質が蓄積することから細胞を助けるが、NMDは、しばしば、前記突然変異によって発生する障害化表現型を部分的に救済することができる活性が残っている断片化タンパク質をコードするmRNAを、消滅させる。従って、少なくとも、PTC変異のいくつかの場合においては、NMDを特異的に阻害することにより、前記遺伝障害を救済するための新規治療方法を提供することができる。

次に、前記方法の可能性を評価するための最初の工程として、前記の断片化タンパク質の合成を特異的に救済するhSMG-1阻害剤の能力を試験した。前記可能性を評価するための系のモデルとしては、前記突然変異を有するセルラインを得ることが可能なので、p53遺伝子を選択した。PTCを有する2種のセルライン、すなわち、第196番目のコドンにおけるPTCを含有するCalu6 (肺腺癌セルライン)、及び第298番目のコドンにおけるPTCを含有するN417 (小細胞肺癌腫セルライン) を選択した [Lehman TA, Cancer Research, 51, 4090-4096 (1991); Bodner SM, Oncogene, 7, 743-749 (1992)]。p53遺伝子の構造並びにセルラインCalu6及びN417中のPTC変異を、図30に模式的に示す。図30において、エキソン (exon) を四角形で示す。

【0121】

Calu6、N417、及びコントロールとしてのA549細胞 [肺腺癌セルライン; Lehman TA, cancer research, 51, 4090-4096 (1991)] を、 $2\mu\text{mol/L}$ ウオートマンニン (wort.

）若しくは $50\mu\text{g}/\text{mL}$ シクロヘキサミド（CHX）の存在下又は不在下（cont.）で、4.5時間処理した後、細胞を回収した。調製した細胞溶解物及び総RNAを、それぞれ、p53プローブを用いるノーザンブロット法及び抗p53抗体（DO-1；カルビオケム社）を用いるウェスタンブロット法によって分析した。アクチン染色を示すCBBイメージも表示する。

【0122】

N417及びA549細胞における結果を図31に示す。図31において、記号「cont.」、記号「wort.」、及び記号「CHX」は、それぞれ、コントロールの結果、ウォートマンニン存在下の結果、及びシクロヘキサミド存在下の結果であることを示す。

N417細胞をウォートマンニンで処理した結果、p53 298 PTC mRNAも、前記断片化p53タンパク質も増加したが、コントロールのA549細胞においては前記mRNAもタンパク質も増加しなかった。

【0123】

更に、種々濃度のウォートマンニン、シクロヘキサミド、又はカフェインで4.5時間処理した場合の結果を、図32に示す。図32において、記号「CHX」は、シクロヘキサミド存在下の結果であることを示す。前記の断片化p53における増加は、calu6細胞を増加量のウォートマンニンで処理した場合にも観察された。

【0124】

【発明の効果】

本発明のポリペプチドによれば、ナンセンス変異によりPTCを生じることが原因で生じる病態の治療剤の簡便なスクリーニング系を提供することができる。また、本発明のポリヌクレオチド、発現ベクター、細胞、及び抗体は、本発明のポリペプチドを製造するのに有用である。

【0125】

【配列表フリーテキスト】

以下の配列表の数字見出し<223>には、「Artificial Sequence」の説明を記載する。具体的には、配列表の配列番号8の配列で糞れ

る塩基配列は、6個のヒスチジン残基を含有するHisタグ配列である。

【0126】

【配列表】

<110> Ohno, Shigeo

<120> Novel SNG-1

<130> YLS01001P

<160> 8

<210> 1

<211> 13110

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (328)..(11301)

<400> 1

ggggaagcag tggccgtgtg agcgtgagga gctgccgcca ccgcctgctc ctcttcctcc 60

tcgtcctccg gggccccagc gtcgtgggcc gcgcacggcc ctggaagaga cgtcgctcgc 120

ccttcacccg cctctctcac cgcgcgctc cctcgtcctg ccctgcgggc tcaggcggaa 180

cccgaacgg ccgtcctctt ccccgccct ccgccgccgc ctcttcctcc tccttctcgg 240

cttcctcctc agccccgggc cggagcgggg tgcggcggc ggccggttcg ggccggcgcg 300

cttgccatg tcgtgcggg gaaggta atg agc cgc aga gcc ccg ggg tct cgg 354

Met Ser Arg Arg Ala Pro Gly Ser Arg

1

5

ctg agc agc ggc ggc acc aac tat tcg cgg agc tgg aat gac tgg caa 402

Leu Ser Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ser Arg Ser Trp Asn Asp Trp Gln

10

15

20

25

ccc aga act gat agt gca tca gct gac cca ggt aat tta aaa tat tct 450

Pro Arg Thr Asp Ser Ala Ser Ala Asp Pro Gly Asn Leu Lys Tyr Ser

30

35

40

tca tcc aga gat aga ggt ggt tct tcc tct tac gga ctg caa cct tca 498

Ser Ser Arg Asp Arg Gly Gly Ser Ser Ser Tyr Gly Leu Gln Pro Ser

45

50

55

aat tca gct gtg gtg tct cgg caa agg cac gat gat acc aga gtc cac 546

Asn Ser Ala Val Val Ser Arg Gln Arg His Asp Asp Thr Arg Val His

60

65

70

gct gac ata cag aat gac gaa aag ggt ggc tac agt gtc aat gga gga 594

Ala Asp Ile Gln Asn Asp Glu Lys Gly Gly Tyr Ser Val Asn Gly Gly

75

80

85

tct ggg gaa aat act tat ggt cgg aag tcg ttg ggg caa gag ctg agg 642

Ser Gly Glu Asn Thr Tyr Gly Arg Lys Ser Leu Gly Gln Glu Leu Arg

90

95

100

105

gtt aac aat gtg acc agc cct gag ttc acc agt gtt cag cat ggc agt 690

Val Asn Asn Val Thr Ser Pro Glu Phe Thr Ser Val Gln His Gly Ser

110

115

120

cgt gct tta gcc acc aaa gac atg agg aaa tca cag gag aga tcg atg 738

Arg Ala Leu Ala Thr Lys Asp Met Arg Lys Ser Gln Glu Arg Ser Met

125

130

135

tct tat tct gat gag tct cga ctg tcg aat ctt ctt cgg agg atc acc 786

Ser Tyr Ser Asp Glu Ser Arg Leu Ser Asn Leu Leu Arg Arg Ile Thr

140

145

150

cgg gaa gac gac aga gac cga aga ttg gct act gta aag cag ttg aaa 834

Arg Glu Asp Asp Arg Asp Arg Arg Leu Ala Thr Val Lys Gln Leu Lys

155

160

165

gaa ttt att cag caa cca gaa aat aag ctg gta cta gtt aaa caa ttg 882

Glu Phe Ile Gln Gln Pro Glu Asn Lys Leu Val Leu Val Lys Gln Leu

170

175

180

185

gat aat atc ttg gct gct gta cat gac gtg ctt aat gaa agt agc aaa 930

Asp Asn Ile Leu Ala Ala Val His Asp Val Leu Asn Glu Ser Ser Lys

190

195

200

ttg ctt cag gag ttg aga cag gag gga gct tgc tgt ctt ggc ctt ctt 978

Leu Leu Gln Glu Leu Arg Gln Glu Gly Ala Cys Cys Leu Gly Leu Leu

205

210

215

tgt gct tct ctg agc tat gag gct gag aag atc ttc aag tgg att ttt 1026
Cys Ala Ser Leu Ser Tyr Glu Ala Glu Lys Ile Phe Lys Trp Ile Phe

220

225

230

agc aaa ttt agc tca tct gca aaa gat gaa gtt aaa ctc ctc tac tta 1074
Ser Lys Phe Ser Ser Ser Ala Lys Asp Glu Val Lys Leu Leu Tyr Leu

235

240

245

tgt gcc acc tac aaa gca cta gag act gta gga gaa aag aaa gcc ttt 1122
Cys Ala Thr Tyr Lys Ala Leu Glu Thr Val Gly Glu Lys Lys Ala Phe

250

255

260

265

tca tct gta atg cag ctt gta atg acc agc ctg cag tct att ctt gaa 1170
Ser Ser Val Met Gln Leu Val Met Thr Ser Leu Gln Ser Ile Leu Glu

270

275

280

aat gtg gat aca cca gaa ttg ctt tgt aaa tgt gtt aag tgc att ctt 1218
Asn Val Asp Thr Pro Glu Leu Leu Cys Lys Cys Val Lys Cys Ile Leu

285

290

295

ttg gtg gct cga tgt tac cct cat att ttc agc act aat ttt agg gat 1266
Leu Val Ala Arg Cys Tyr Pro His Ile Phe Ser Thr Asn Phe Arg Asp

300

305

310

aca gtt gat ata tta gtt gga tgg cat ata gat cat act cag aaa cct 1314
Thr Val Asp Ile Leu Val Gly Trp His Ile Asp His Thr Gln Lys Pro

315

320

325

tcg ctc acg cag cag gta tct ggg tgg ttg cag agt ttg gag cca ttt 1362

Ser Leu Thr Gln Gln Val Ser Gly Trp Leu Gln Ser Leu Glu Pro Phe
 330 335 340 345

tgg gta gct gat ctt gca ttt tct act act ctt ctt ggt cag ttt ctg 1410
 Trp Val Ala Asp Leu Ala Phe Ser Thr Thr Leu Leu Gly Gln Phe Leu
 350 355 360

gaa gac atg gaa gca tat gct gag gac ctc agc cat gtg gcc tct ggg 1458
 Glu Asp Met Glu Ala Tyr Ala Glu Asp Leu Ser His Val Ala Ser Gly
 365 370 375

gaa tca gtg gat gaa gat gtc cct cct cca tca gtg tca tta cca aag 1506
 Glu Ser Val Asp Glu Asp Val Pro Pro Pro Ser Val Ser Leu Pro Lys
 380 385 390

ctg gct gca ctt ctc cgg gta ttt agt act gtg gtg agg agc att ggg 1554
 Leu Ala Ala Leu Leu Arg Val Phe Ser Thr Val Val Arg Ser Ile Gly
 395 400 405

gaa cgc ttc agc cca att cgg ggt cct cca att act gag gca tat gta 1602
 Glu Arg Phe Ser Pro Ile Arg Gly Pro Pro Ile Thr Glu Ala Tyr Val
 410 415 420 425

aca gat gtt ctg tac aga gta atg aga tgt gtg acg gct gca aac cag 1650
 Thr Asp Val Leu Tyr Arg Val Met Arg Cys Val Thr Ala Ala Asn Gln
 430 435 440

gtg ttt ttt tct gag gct gtg ttg aca gct gct aat gag tgt gtt ggt 1698
 Val Phe Phe Ser Glu Ala Val Leu Thr Ala Ala Asn Glu Cys Val Gly

445	450	455	
gtt ttg ctc ggc agc ttg gat cct agc atg act ata cat tgt gac atg 1746			
Val Leu Leu Gly Ser Leu Asp Pro Ser Met Thr Ile His Cys Asp Met			
460	465	470	
gtc att aca tat gga tta gac caa ctg gag aat tgc cag act tgt ggt 1794			
Val Ile Thr Tyr Gly Leu Asp Gln Leu Glu Asn Cys Gln Thr Cys Gly			
475	480	485	
acc gat tat atc atc tca gtc ttg aat tta ctc acg ctg att gtt gaa 1842			
Thr Asp Tyr Ile Ile Ser Val Leu Asn Leu Leu Thr Leu Ile Val Glu			
490	495	500	505
cag ata aat acg aaa ctg cca tca tca ttt gta gaa aaa ctg ttt ata 1890			
Gln Ile Asn Thr Lys Leu Pro Ser Ser Phe Val Glu Lys Leu Phe Ile			
510	515	520	
cca tca tct aaa cta cta ttc ttg cgt tat cat aaa gaa aaa gag gtt 1938			
Pro Ser Ser Lys Leu Leu Phe Leu Arg Tyr His Lys Glu Lys Glu Val			
525	530	535	
gtt gct gta gcc cat gct gtt tat caa gca gtg ctc agc ttg aag aat 1986			
Val Ala Val Ala His Ala Val Tyr Gln Ala Val Leu Ser Leu Lys Asn			
540	545	550	
att cct gtt ttg gag act gcc tat aag tta ata ttg gga gaa atg act 2034			
Ile Pro Val Leu Glu Thr Ala Tyr Lys Leu Ile Leu Gly Glu Met Thr			
555	560	565	

tgt gcc cta aac aac ctc cta cac agt cta caa ctt cct gag gcc tgt 2082
 Cys Ala Leu Asn Asn Leu Leu His Ser Leu Gln Leu Pro Glu Ala Cys
 570 575 580 585

tct gaa ata aaa cat gag gct ttt aag aat cat gtg ttc aat gta gac 2130
 Ser Glu Ile Lys His Glu Ala Phe Lys Asn His Val Phe Asn Val Asp
 590 595 600

aat gca aaa ttt gta gtt aaa ttt gac ctc agt gcc ctg act aca att 2178
 Asn Ala Lys Phe Val Val Lys Phe Asp Leu Ser Ala Leu Thr Thr Ile
 605 610 615

gga aat gcc aaa aac tca cta ata ggg atg tgg gcg cta tct cca act 2226
 Gly Asn Ala Lys Asn Ser Leu Ile Gly Met Trp Ala Leu Ser Pro Thr
 620 625 630

gtc ttt gca ctt ctg agt aag aat ctg atg att gtg cac agt gac ctg 2274
 Val Phe Ala Leu Leu Ser Lys Asn Leu Met Ile Val His Ser Asp Leu
 635 640 645

gct gtt cac ttc cct gcc att cag tat gct gtg ctc tac aca ttg tat 2322
 Ala Val His Phe Pro Ala Ile Gln Tyr Ala Val Leu Tyr Thr Leu Tyr
 650 655 660 665

tct cat tgt acc agg cat gat cac ttt atc tct agt agc ctc agt tct 2370
 Ser His Cys Thr Arg His Asp His Phe Ile Ser Ser Ser Leu Ser Ser
 670 675 680

gcc tct cct tct ttg ttt gat gga gct gtg att agc act gta act acg 2418
Ala Ser Pro Ser Leu Phe Asp Gly Ala Val Ile Ser Thr Val Thr Thr

685

690

695

gct aca aag aaa cat ttc tca att ata tta aat ctt ctg gga ata tta 2466
Ala Thr Lys Lys His Phe Ser Ile Ile Leu Asn Leu Leu Gly Ile Leu

700

705

710

ctt aag aaa gat aac ctt aac cag gac acg agg aaa ctg tta atg act 2514
Leu Lys Lys Asp Asn Leu Asn Gln Asp Thr Arg Lys Leu Leu Met Thr

715

720

725

tgg gct ttg gaa gca gct gtt tta atg agg aag tct gaa aca tac gca 2562
Trp Ala Leu Glu Ala Ala Val Leu Met Arg Lys Ser Glu Thr Tyr Ala

730

735

740

745

cct tta ttc tct ctt ccg tct ttc cat aaa ttt tgc aaa ggc ctt tta 2610
Pro Leu Phe Ser Leu Pro Ser Phe His Lys Phe Cys Lys Gly Leu Leu

750

755

760

gcc aac act ctc gtt gaa gat gtg aat atc tgt ctg cag gca tgc agc 2658
Ala Asn Thr Leu Val Glu Asp Val Asn Ile Cys Leu Gln Ala Cys Ser

765

770

775

agt cta cat gct ctg tcc tct tcc ttg cca gat gat ctt tta cag aga 2706
Ser Leu His Ala Leu Ser Ser Ser Leu Pro Asp Asp Leu Leu Gln Arg

780

785

790

tgt gtc gat gtt tgc cgt gtt caa cta gtg cac agt gga act cgt att 2754

Cys Val Asp Val Cys Arg Val Gln Leu Val His Ser Gly Thr Arg Ile	
795	800
	805
cga caa gca ttt gga aaa ctg ttg aaa tca att cct tta gat gtt gtc	2802
Arg Gln Ala Phe Gly Lys Leu Leu Lys Ser Ile Pro Leu Asp Val Val	
810	815
	820
	825
cta agc aat aac aat cac aca gaa att caa gaa att tct tta gca tta	2850
Leu Ser Asn Asn Asn His Thr Glu Ile Gln Glu Ile Ser Leu Ala Leu	
	830
	835
	840
aga agt cac atg agt aaa gca cca agt aat aca ttc cac ccc caa gat	2898
Arg Ser His Met Ser Lys Ala Pro Ser Asn Thr Phe His Pro Gln Asp	
	845
	850
	855
ttc tct gat gtt att agt ttt att ttg tat ggg aac tct cat aga aca	2946
Phe Ser Asp Val Ile Ser Phe Ile Leu Tyr Gly Asn Ser His Arg Thr	
	860
	865
	870
ggg aag gac aat tgg ttg gaa aga ctg ttc tat agc tgc cag aga ctg	2994
Gly Lys Asp Asn Trp Leu Glu Arg Leu Phe Tyr Ser Cys Gln Arg Leu	
	875
	880
	885
gat aag cgt gac cag tca aca att cca cgc aat ctc ctg aag aca gat	3042
Asp Lys Arg Asp Gln Ser Thr Ile Pro Arg Asn Leu Leu Lys Thr Asp	
	890
	895
	900
	905
gct gtc ctt tgg cag tgg gcc ata tgg gaa gct gca caa ttc act gtt	3090
Ala Val Leu Trp Gln Trp Ala Ile Trp Glu Ala Ala Gln Phe Thr Val	

910	915	920	
ctt tct aag ctg aga acc cca ctg ggc aga gct caa gac acc ttc cag			3138
Leu Ser Lys Leu Arg Thr Pro Leu Gly Arg Ala Gln Asp Thr Phe Gln			
925	930	935	
aca att gaa ggt atc att cga agt ctc gca gct cac aca tta aac cct			3186
Thr Ile Glu Gly Ile Ile Arg Ser Leu Ala Ala His Thr Leu Asn Pro			
940	945	950	
gat cag gat gtt agt cag tgg aca act gca gac aat gat gaa ggc cat			3234
Asp Gln Asp Val Ser Gln Trp Thr Thr Ala Asp Asn Asp Glu Gly His			
955	960	965	
ggt aac aac caa ctt aga ctt gtt ctt ctt ctg cag tat ctg gaa aat			3282
Gly Asn Asn Gln Leu Arg Leu Val Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Glu Asn			
970	975	980	985
ctg gag aaa tta atg tat aat gca tac gag gga tgt gct aat gca tta			3330
Leu Glu Lys Leu Met Tyr Asn Ala Tyr Glu Gly Cys Ala Asn Ala Leu			
990	995	1000	
act tca cct ccc aag gtc att aga act ttt ttc tat acc aat cgc caa			3378
Thr Ser Pro Pro Lys Val Ile Arg Thr Phe Phe Tyr Thr Asn Arg Gln			
1005	1010	1015	
act tgt cag gac tgg cta acg cgg att cga ctc tcc atc atg agg gta			3426
Thr Cys Gln Asp Trp Leu Thr Arg Ile Arg Leu Ser Ile Met Arg Val			
1020	1025	1030	

gga ttg ttg gca ggc cag cct gca gtg aca gtg aga cat ggc ttt gac 3474
Gly Leu Leu Ala Gly Gln Pro Ala Val Thr Val Arg His Gly Phe Asp

1035

1040

1045

ttg ctt aca gag atg aaa aca acc agc cta tct cag ggg aat gaa ttg 3522
Leu Leu Thr Glu Met Lys Thr Thr Ser Leu Ser Gln Gly Asn Glu Leu

1050

1055

1060

1065

gaa gta acc att atg atg gtg gta gaa gca tta tgt gaa ctt cat tgt 3570
Glu Val Thr Ile Met Met Val Val Glu Ala Leu Cys Glu Leu His Cys

1070

1075

1080

cct gaa gct ata cag gga att gct gtc tgg tca tca tct att gtt gga 3618
Pro Glu Ala Ile Gln Gly Ile Ala Val Trp Ser Ser Ser Ile Val Gly

1085

1090

1095

aaa aat ctt ctg tgg att aac tca gtg gct caa cag gct gaa ggg agg 3666
Lys Asn Leu Leu Trp Ile Asn Ser Val Ala Gln Gln Ala Glu Gly Arg

1100

1105

1110

ttt gaa aag gcc tct gtg gag tac cag gaa cac ctg tgt gcc atg aca 3714
Phe Glu Lys Ala Ser Val Glu Tyr Gln Glu His Leu Cys Ala Met Thr

1115

1120

1125

ggg gtt gat tgc tgc atc tcc agc ttt gac aaa tcg gtg ctc acc tta 3762
Gly Val Asp Cys Cys Ile Ser Ser Phe Asp Lys Ser Val Leu Thr Leu

1130

1135

1140

1145

gcc aat gct ggg cgt aac agt gcc agc ccg aaa cat tct ctg aat ggt 3810
Ala Asn Ala Gly Arg Asn Ser Ala Ser Pro Lys His Ser Leu Asn Gly
1150 1155 1160

gaa tcc aga aaa act gtg ctg tcc aaa ccg act gac tct tcc cct gag 3858
Glu Ser Arg Lys Thr Val Leu Ser Lys Pro Thr Asp Ser Ser Pro Glu
1165 1170 1175

gtt ata aat tat tta gga aat aaa gca tgt gag ttc tac atc tca att 3906
Val Ile Asn Tyr Leu Gly Asn Lys Ala Cys Glu Phe Tyr Ile Ser Ile
1180 1185 1190

gcc gat tgg gct gct gtg cag gaa tgg cag aac gct atc cat gac ttg 3954
Ala Asp Trp Ala Ala Val Gln Glu Trp Gln Asn Ala Ile His Asp Leu
1195 1200 1205

aaa aag agt acc agt agc act tcc ctc aac ctg aaa gct gac ttc aac 4002
Lys Lys Ser Thr Ser Ser Thr Ser Leu Asn Leu Lys Ala Asp Phe Asn
1210 1215 1220 1225

tat ata aaa tca tta agc agc ttt gag tct gga aaa ttt gtt gaa tgt 4050
Tyr Ile Lys Ser Leu Ser Ser Phe Glu Ser Gly Lys Phe Val Glu Cys
1230 1235 1240

acc gag cag tta gaa ttg tta cca gga gaa aat atc aat cta ctt gct 4098
Thr Glu Gln Leu Glu Leu Leu Pro Gly Glu Asn Ile Asn Leu Leu Ala
1245 1250 1255

gga gga tca aaa gaa aaa ata gac atg aaa aaa ctg ctt cct aac atg 4146

Gly Gly Ser Lys Glu Lys Ile Asp Met Lys Lys Leu Leu Pro Asn Met

1260

1265

1270

tta agt ccg gat ccg agg gaa ctt cag aaa tcc att gaa gtt caa ttg 4194

Leu Ser Pro Asp Pro Arg Glu Leu Gln Lys Ser Ile Glu Val Gln Leu

1275

1280

1285

tta aga agt tct gtt tgt ttg gca act gct tta aac ccg ata gaa caa 4242

Leu Arg Ser Ser Val Cys Leu Ala Thr Ala Leu Asn Pro Ile Glu Gln

1290

1295

1300

1305

gat cag aag tgg cag tct ata act gaa aat gtg gta aag tac ttg aag 4290

Asp Gln Lys Trp Gln Ser Ile Thr Glu Asn Val Val Lys Tyr Leu Lys

1310

1315

1320

caa aca tcc cgc atc gct att gga cct ctg aga ctt tct act tta aca 4338

Gln Thr Ser Arg Ile Ala Ile Gly Pro Leu Arg Leu Ser Thr Leu Thr

1325

1330

1335

gtt tca cag tct ttg cca gtt cta agt acc ttg cag ctg tat tgc tca 4386

Val Ser Gln Ser Leu Pro Val Leu Ser Thr Leu Gln Leu Tyr Cys Ser

1340

1345

1350

tct gct ttg gag aac aca gtt tct aac aga ctt tca aca gag gac tgt 4434

Ser Ala Leu Glu Asn Thr Val Ser Asn Arg Leu Ser Thr Glu Asp Cys

1355

1360

1365

ctt att cca ctc ttc agt gaa gct tta cgt tca tgt aaa cag cat gac 4482

Leu Ile Pro Leu Phe Ser Glu Ala Leu Arg Ser Cys Lys Gln His Asp

1370	1375	1380	1385
gtg agg cca tgg atg cag gca tta agg tat act atg tac cag aat cag 4530			
Val Arg Pro Trp Met Gln Ala Leu Arg Tyr Thr Met Tyr Gln Asn Gln			
1390	1395	1400	
ttg ttg gag aaa att aaa gaa caa aca gtc cca att aga agc cat ctc 4578			
Leu Leu Glu Lys Ile Lys Glu Gln Thr Val Pro Ile Arg Ser His Leu			
1405	1410	1415	
atg gaa tta ggt cta aca gca gca aaa ttt gct aga aaa cga ggg aat 4626			
Met Glu Leu Gly Leu Thr Ala Ala Lys Phe Ala Arg Lys Arg Gly Asn			
1420	1425	1430	
gtg tcc ctt gca aca aga ctg ctg gca cag tgc agt gaa gtt cag ctg 4674			
Val Ser Leu Ala Thr Arg Leu Leu Ala Gln Cys Ser Glu Val Gln Leu			
1435	1440	1445	
gga aag acc acc act gca cag gat tta gtc caa cat ttt aaa aaa cta 4722			
Gly Lys Thr Thr Thr Ala Gln Asp Leu Val Gln His Phe Lys Lys Leu			
1450	1455	1460	1465
tca acc caa ggt caa gtg gat gaa aaa tgg ggg ccc gaa ctt gat att 4770			
Ser Thr Gln Gly Gln Val Asp Glu Lys Trp Gly Pro Glu Leu Asp Ile			
1470	1475	1480	
gaa aaa acc aaa ttg ctt tat aca gca ggc cag tca aca cat gca atg 4818			
Glu Lys Thr Lys Leu Leu Tyr Thr Ala Gly Gln Ser Thr His Ala Met			
1485	1490	1495	

gaa atg ttg agt tct tgt gcc ata tct ttc tgc aag tct gtg aaa gct 4866

Glu Met Leu Ser Ser Cys Ala Ile Ser Phe Cys Lys Ser Val Lys Ala

1500

1505

1510

gaa tat gca gtt gct aaa tca att ctg aca ctg gct aaa tgg atc cag 4914

Glu Tyr Ala Val Ala Lys Ser Ile Leu Thr Leu Ala Lys Trp Ile Gln

1515

1520

1525

gca gaa tgg aaa gag att tca gga cag ctg aaa cag gtt tac aga gct 4962

Ala Glu Trp Lys Glu Ile Ser Gly Gln Leu Lys Gln Val Tyr Arg Ala

1530

1535

1540

1545

cag cac caa cag aac ttc aca ggt ctt tct act ttg tct aaa aac ata 5010

Gln His Gln Gln Asn Phe Thr Gly Leu Ser Thr Leu Ser Lys Asn Ile

1550

1555

1560

ctc act cta ata gaa ctg cca tct gtt aat acg atg gaa gaa gag tat 5058

Leu Thr Leu Ile Glu Leu Pro Ser Val Asn Thr Met Glu Glu Glu Tyr

1565

1570

1575

cct cgg atc gag agt gaa tct aca gtg cat att gga gtt gga gaa cct 5106

Pro Arg Ile Glu Ser Glu Ser Thr Val His Ile Gly Val Gly Glu Pro

1580

1585

1590

gac ttc att ttg gga cag ttg tat cac ctg tct tca gta cag gca cct 5154

Asp Phe Ile Leu Gly Gln Leu Tyr His Leu Ser Ser Val Gln Ala Pro

1595

1600

1605

gaa gta gcc aaa tct tgg gca gcg ttg gcc agc tgg gct tat agg tgg 5202
 Glu Val Ala Lys Ser Trp Ala Ala Leu Ala Ser Trp Ala Tyr Arg Trp
 1610 1615 1620 1625

ggc aga aag gtg gtt gac aat gcc agt cag gga gaa ggt gtt cgt ctg 5250
 Gly Arg Lys Val Val Asp Asn Ala Ser Gln Gly Glu Gly Val Arg Leu
 1630 1635 1640

ctg cct aga gaa aaa tct gaa gtt cag aat cta ctt cca gac act ata 5298
 Leu Pro Arg Glu Lys Ser Glu Val Gln Asn Leu Leu Pro Asp Thr Ile
 1645 1650 1655

act gag gaa gag aaa gag aga ata tat ggt att ctt gga cag gct gtg 5346
 Thr Glu Glu Glu Lys Glu Arg Ile Tyr Gly Ile Leu Gly Gln Ala Val
 1660 1665 1670

tgt cgg ccg gcg ggg att cag gat gaa gat ata aca ctt cag ata act 5394
 Cys Arg Pro Ala Gly Ile Gln Asp Glu Asp Ile Thr Leu Gln Ile Thr
 1675 1680 1685

gag agt gaa gac aac gaa gaa gat gac atg gtt gat gtt atc tgg cgt 5442
 Glu Ser Glu Asp Asn Glu Glu Asp Asp Met Val Asp Val Ile Trp Arg
 1690 1695 1700 1705

cag ttg ata tca agc tgc cca tgg ctt tca gaa ctt gat gaa agt gca 5490
 Gln Leu Ile Ser Ser Cys Pro Trp Leu Ser Glu Leu Asp Glu Ser Ala
 1710 1715 1720

act gaa gga gtt att aaa gtg tgg agg aaa gtt gta gat aga ata ttc 5538

Thr Glu Gly Val Ile Lys Val Trp Arg Lys Val Val Asp Arg Ile Phe
1725 1730 1735

agc ctg tac aaa ctc tct tgc agt gca tac ttt act ttc ctt aaa ctc 5586
Ser Leu Tyr Lys Leu Ser Cys Ser Ala Tyr Phe Thr Phe Leu Lys Leu
1740 1745 1750

aac gct ggt caa att cct tta gat gag gat gac cct agg ctg cat tta 5634
Asn Ala Gly Gln Ile Pro Leu Asp Glu Asp Asp Pro Arg Leu His Leu
1755 1760 1765

agt cac aga gtg gaa cag agc act gat gac atg att gtg atg gcc aca 5682
Ser His Arg Val Glu Gln Ser Thr Asp Asp Met Ile Val Met Ala Thr
1770 1775 1780 1785

ttg cgc ctg ctg cgg ttg ctc gtg aag cat gct ggt gag ctt cgg cag 5730
Leu Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Lys His Ala Gly Glu Leu Arg Gln
1790 1795 1800

tat ctg gag cac ggc ttg gag aca aca ccc act gca cca tgg agg gga 5778
Tyr Leu Glu His Gly Leu Glu Thr Thr Pro Thr Ala Pro Trp Arg Gly
1805 1810 1815

att att ccg caa ctt ttc tca cgc tta aac cac cct gaa gtg tat gtg 5826
Ile Ile Pro Gln Leu Phe Ser Arg Leu Asn His Pro Glu Val Tyr Val
1820 1825 1830

cgc caa agt att tgt aac ctt ctc tgc cgt gtg gct caa gat tcc cca 5874
Arg Gln Ser Ile Cys Asn Leu Leu Cys Arg Val Ala Gln Asp Ser Pro

1835	1840	1845	
cat ctc ata ttg tat cct gca ata gtg ggt acc ata tcg ctt agt agt			5922
His Leu Ile Leu Tyr Pro Ala Ile Val Gly Thr Ile Ser Leu Ser Ser			
1850	1855	1860	1865
gaa tcc cag gct tca gga aat aaa ttt tcc act gca att cca act tta			5970
Glu Ser Gln Ala Ser Gly Asn Lys Phe Ser Thr Ala Ile Pro Thr Leu			
	1870	1875	1880
ctt ggc aat att caa gga gaa gaa ttg ctg gtt tct gaa tgt gag gga			6018
Leu Gly Asn Ile Gln Gly Glu Glu Leu Leu Val Ser Glu Cys Glu Gly			
	1885	1890	1895
gga agt cct cct gca tct cag gat agc aat aag gat gaa cct aaa agt			6066
Gly Ser Pro Pro Ala Ser Gln Asp Ser Asn Lys Asp Glu Pro Lys Ser			
	1900	1905	1910
gga tta aat gaa gac caa gcc atg atg cag gat tgt tac agc aaa att			6114
Gly Leu Asn Glu Asp Gln Ala Met Met Gln Asp Cys Tyr Ser Lys Ile			
	1915	1920	1925
gta gat aag ctg tcc tct gca aac ccc acc atg gta tta cag gtt cag			6162
Val Asp Lys Leu Ser Ser Ala Asn Pro Thr Met Val Leu Gln Val Gln			
1930	1935	1940	1945
atg ctc gtg gct gaa ctg cgc agg gtc act gtg ctc tgg gat gag ctc			6210
Met Leu Val Ala Glu Leu Arg Arg Val Thr Val Leu Trp Asp Glu Leu			
	1950	1955	1960

tgg ctg gga gtt ttg ctg caa caa cac atg tat gtc ctg aga cga att 6258

Trp Leu Gly Val Leu Leu Gln Gln His Met Tyr Val Leu Arg Arg Ile

1965

1970

1975

cag cag ctt gaa gat gag gtg aag aga gtc cag aac aac aac acc tta 6306

Gln Gln Leu Glu Asp Glu Val Lys Arg Val Gln Asn Asn Asn Thr Leu

1980

1985

1990

cgc aaa gaa gag aaa att gca atc atg agg gag agg cac aca gct ttg 6354

Arg Lys Glu Glu Lys Ile Ala Ile Met Arg Glu Arg His Thr Ala Leu

1995

2000

2005

atg aag ccc atc gta ttt gct ttg gag cat gtg agg agt atc aca gcg 6402

Met Lys Pro Ile Val Phe Ala Leu Glu His Val Arg Ser Ile Thr Ala

2010

2015

2020

2025

gct cct gca gaa aca cct cat gaa aaa tgg ttt cag gat aac tat ggt 6450

Ala Pro Ala Glu Thr Pro His Glu Lys Trp Phe Gln Asp Asn Tyr Gly

2030

2035

2040

gat gcc att gaa aat gcc cta gaa aaa ctg aag act cca ttg aac cct 6498

Asp Ala Ile Glu Asn Ala Leu Glu Lys Leu Lys Thr Pro Leu Asn Pro

2045

2050

2055

gca aag cct ggg agc agc tgg att cca ttt aaa gag ata atg cta agt 6546

Ala Lys Pro Gly Ser Ser Trp Ile Pro Phe Lys Glu Ile Met Leu Ser

2060

2065

2070

ttg caa cag aga gca cag aaa cgt gca agt tac atc ttg cgt ctt gaa 6594
Leu Gln Gln Arg Ala Gln Lys Arg Ala Ser Tyr Ile Leu Arg Leu Glu

2075

2080

2085

gaa atc agt cca tgg ttg gct gcc atg act aac act gaa att gct ctt 6642
Glu Ile Ser Pro Trp Leu Ala Ala Met Thr Asn Thr Glu Ile Ala Leu

2090

2095

2100

2105

cct ggg gaa gtc tca gcc aga gac act gtc aca atc cat agt gtg ggc 6690
Pro Gly Glu Val Ser Ala Arg Asp Thr Val Thr Ile His Ser Val Gly

2110

2115

2120

gga acc atc aca atc tta ccg act aaa acc aag cca aag aaa ctt ctc 6738
Gly Thr Ile Thr Ile Leu Pro Thr Lys Thr Lys Pro Lys Lys Leu Leu

2125

2130

2135

ttt ctt gga tca gat ggg aag agc tat cct tat ctt ttc aaa gga ctg 6786
Phe Leu Gly Ser Asp Gly Lys Ser Tyr Pro Tyr Leu Phe Lys Gly Leu

2140

2145

2150

gag gat tta cat ctg gat gag aga ata atg cag ttc cta tct att gtg 6834
Glu Asp Leu His Leu Asp Glu Arg Ile Met Gln Phe Leu Ser Ile Val

2155

2160

2165

aat acc atg ttt gct aca att aat cgc caa gaa aca ccc cgg ttc cat 6882
Asn Thr Met Phe Ala Thr Ile Asn Arg Gln Glu Thr Pro Arg Phe His

2170

2175

2180

2185

gct cga.cac tat tct gta aca cca cta gga aca aga tca gga cta atc 6930

Ala Arg His Tyr Ser Val Thr Pro Leu Gly Thr Arg Ser Gly Leu Ile	
2190 2195 2200	
cag tgg gta gat gga gcc aca ccc tta ttt ggt ctt tac aaa cga tgg	6978
Gln Trp Val Asp Gly Ala Thr Pro Leu Phe Gly Leu Tyr Lys Arg Trp	
2205 2210 2215	
caa caa cgg gaa gct gcc tta caa gca caa aag gcc caa gat tcc tac	7026
Gln Gln Arg Glu Ala Ala Leu Gln Ala Gln Lys Ala Gln Asp Ser Tyr	
2220 2225 2230	
caa act cct cag aat cct gga att gta ccc cgt cct agt gaa ctt tat	7074
Gln Thr Pro Gln Asn Pro Gly Ile Val Pro Arg Pro Ser Glu Leu Tyr	
2235 2240 2245	
tac agt aaa att ggc cct gct ttg aaa aca gtt ggg ctt agc ctg gat	7122
Tyr Ser Lys Ile Gly Pro Ala Leu Lys Thr Val Gly Leu Ser Leu Asp	
2250 2255 2260 2265	
gtg tcc cgt cgg gat tgg cct ctt cat gta atg aag gca gta ttg gaa	7170
Val Ser Arg Arg Asp Trp Pro Leu His Val Met Lys Ala Val Leu Glu	
2270 2275 2280	
gag tta atg gag gcc aca ccc ccg aat ctc ctt gcc aaa gag ctc tgg	7218
Glu Leu Met Glu Ala Thr Pro Pro Asn Leu Leu Ala Lys Glu Leu Trp	
2285 2290 2295	
tca tct tgc aca aca cct gat gaa tgg tgg aga gtt acg cag tct tat	7266
Ser Ser Cys Thr Thr Pro Asp Glu Trp Trp Arg Val Thr Gln Ser Tyr	

2300	2305	2310	
gca aga tct act gca gtc atg tct atg gtt gga tac ata att ggc ctt 7314			
Ala Arg Ser Thr Ala Val Met Ser Met Val Gly Tyr Ile Ile Gly Leu			
2315	2320	2325	
gga gac aga cat ctg gat aat gtt ctt ata gat atg acg act gga gaa 7362			
Gly Asp Arg His Leu Asp Asn Val Leu Ile Asp Met Thr Thr Gly Glu			
2330	2335	2340	2345
gtt gtt cac ata gat tac aat gtt tgc ttt gaa aaa ggt aaa agc ctt 7410			
Val Val His Ile Asp Tyr Asn Val Cys Phe Glu Lys Gly Lys Ser Leu			
2350	2355	2360	
aga gtt cct gag aaa gta cct ttt cga atg aca caa aac att gaa aca 7458			
Arg Val Pro Glu Lys Val Pro Phe Arg Met Thr Gln Asn Ile Glu Thr			
2365	2370	2375	
gca ctg ggt gta act gga gta gaa ggt gta ttt agg ctt tca tgt gag 7506			
Ala Leu Gly Val Thr Gly Val Glu Gly Val Phe Arg Leu Ser Cys Glu			
2380	2385	2390	
cag gtt tta cac att atg cgg cgt ggc aga gag acc ctg ctg acg ctg 7554			
Gln Val Leu His Ile Met Arg Arg Gly Arg Glu Thr Leu Leu Thr Leu			
2395	2400	2405	
ctg gag gcc ttt gtg tac gac cct ctg gtg gac tgg aca gca gga ggc 7602			
Leu Glu Ala Phe Val Tyr Asp Pro Leu Val Asp Trp Thr Ala Gly Gly			
2410	2415	2420	2425

gag gct ggg ttt gct ggt gct gtc tat ggt gga ggt ggc cag cag gcc 7650

Glu Ala Gly Phe Ala Gly Ala Val Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Gln Ala

2430

2435

2440

gag agc aag cag agc aag aga gag atg gag cga gag atc acc cgc agc 7698

Glu Ser Lys Gln Ser Lys Arg Glu Met Glu Arg Glu Ile Thr Arg Ser

2445

2450

2455

ctg ttt tct tct aga gta gct gag att aag gtg aac tgg ttt aag aat 7746

Leu Phe Ser Ser Arg Val Ala Glu Ile Lys Val Asn Trp Phe Lys Asn

2460

2465

2470

aga gat gag atg ctg gtt gtg ctt ccc aag ttg gac ggt agc tta gat 7794

Arg Asp Glu Met Leu Val Val Leu Pro Lys Leu Asp Gly Ser Leu Asp

2475

2480

2485

gaa tac cta agc ttg caa gag caa ctg aca gat gtg gaa aaa ctg cag 7842

Glu Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Gln Leu Thr Asp Val Glu Lys Leu Gln

2490

2495

2500

2505

ggc aaa cta ctg gag gaa ata gag ttt cta gaa gga gct gaa ggg gtg 7890

Gly Lys Leu Leu Glu Glu Ile Glu Phe Leu Glu Gly Ala Glu Gly Val

2510

2515

2520

gat cat cct tct cat act ctg caa cac agg tat tct gag cac acc caa 7938

Asp His Pro Ser His Thr Leu Gln His Arg Tyr Ser Glu His Thr Gln

2525

2530

2535

cta cag act cag caa aga gct gtt cag gaa gca atc cag gtg aag ctg 7986
 Leu Gln Thr Gln Gln Arg Ala Val Gln Glu Ala Ile Gln Val Lys Leu
 2540 2545 2550

aat gaa ttt gaa caa tgg ata aca cat tat cag gct gca ttc aat aat 8034
 Asn Glu Phe Glu Gln Trp Ile Thr His Tyr Gln Ala Ala Phe Asn Asn
 2555 2560 2565

tta gaa gca aca cag ctt gca agc ttg ctt caa gag ata agc aca caa 8082
 Leu Glu Ala Thr Gln Leu Ala Ser Leu Leu Gln Glu Ile Ser Thr Gln
 2570 2575 2580 2585

atg gac ctt ggt cct cca agt tac gtg cca gca aca gcc ttt ctg cag 8130
 Met Asp Leu Gly Pro Pro Ser Tyr Val Pro Ala Thr Ala Phe Leu Gln
 2590 2595 2600

aat gct ggt cag gcc cac ttg att agc cag tgc gag cag ctg gag ggg 8178
 Asn Ala Gly Gln Ala His Leu Ile Ser Gln Cys Glu Gln Leu Glu Gly
 2605 2610 2615

gag gtt ggt gct ctc ctg cag cag agg cgc tcc gtg ctc cgt ggc tgt 8226
 Glu Val Gly Ala Leu Leu Gln Gln Arg Arg Ser Val Leu Arg Gly Cys
 2620 2625 2630

ctg gag caa ctg cat cac tat gca acc gtg gcc ctg cag tat ccg aag 8274
 Leu Glu Gln Leu His His Tyr Ala Thr Val Ala Leu Gln Tyr Pro Lys
 2635 2640 2645

gcc ata ttt cag aaa cat cga att gaa cag tgg aag acc tgg atg gaa 8322

Ala Ile Phe Gln Lys His Arg Ile Glu Gln Trp Lys Thr Trp Met Glu
2650 2655 2660 2665

gag ctc atc tgt aac acc aca gta gag cgt tgt caa gag ctc tat agg 8370
Glu Leu Ile Cys Asn Thr Thr Val Glu Arg Cys Gln Glu Leu Tyr Arg
2670 2675 2680

aaa tat gaa atg caa tat gct ccc cag cca ccc cca aca gtg tgt cag 8418
Lys Tyr Glu Met Gln Tyr Ala Pro Gln Pro Pro Pro Thr Val Cys Gln
2685 2690 2695

ttc atc act gcc act gaa atg acc ctg cag cga tac gca gca gac atc 8466
Phe Ile Thr Ala Thr Glu Met Thr Leu Gln Arg Tyr Ala Ala Asp Ile
2700 2705 2710

aac agc aga ctt att aga caa gtg gaa cgc ttg aaa cag gaa gct gtc 8514
Asn Ser Arg Leu Ile Arg Gln Val Glu Arg Leu Lys Gln Glu Ala Val
2715 2720 2725

act gtg cca gtt tgt gaa gat cag ttg aaa gaa att gaa cgt tgc att 8562
Thr Val Pro Val Cys Glu Asp Gln Leu Lys Glu Ile Glu Arg Cys Ile
2730 2735 2740 2745

aaa gtt ttc ctt cat gag aat gga gaa gaa gga tct ttg agt cta gca 8610
Lys Val Phe Leu His Glu Asn Gly Glu Glu Gly Ser Leu Ser Leu Ala
2750 2755 2760

agt gtt att att tct gcc ctt tgt acc ctt aca agg cgt aac ctg atg 8658
Ser Val Ile Ile Ser Ala Leu Cys Thr Leu Thr Arg Arg Asn Leu Met

2765	2770	2775	
atg gaa ggt gca gcg tca agt gct gga gaa cag ctg gtt gat ctg act 8706			
Met Glu Gly Ala Ala Ser Ser Ala Gly Glu Gln Leu Val Asp Leu Thr			
2780	2785	2790	
tct cgg gat gga gcc tgg ttc ttg gag gaa ctc tgc agt atg agc gga 8754			
Ser Arg Asp Gly Ala Trp Phe Leu Glu Glu Leu Cys Ser Met Ser Gly			
2795	2800	2805	
aac gtc acc tgc ttg gtt cag tta ctg aag cag tgc cac ctg gtg cca 8802			
Asn Val Thr Cys Leu Val Gln Leu Leu Lys Gln Cys His Leu Val Pro			
2810	2815	2820	2825
cag gac tta gat atc ccg aac ccc atg gaa gcg tct gag aca gtt cac 8850			
Gln Asp Leu Asp Ile Pro Asn Pro Met Glu Ala Ser Glu Thr Val His			
2830	2835	2840	
tta gcc aat gga gtg tat acc tca ctt cag gaa ttg aat tcg aat ttc 8898			
Leu Ala Asn Gly Val Tyr Thr Ser Leu Gln Glu Leu Asn Ser Asn Phe			
2845	2850	2855	
cgg caa atc ata ttt cca gaa gca ctt cga tgt tta atg aaa ggg gaa 8946			
Arg Gln Ile Ile Phe Pro Glu Ala Leu Arg Cys Leu Met Lys Gly Glu			
2860	2865	2870	
tac acg tta gaa agt atg ctg cat gaa ctg gac ggt ctt att gag cag 8994			
Tyr Thr Leu Glu Ser Met Leu His Glu Leu Asp Gly Leu Ile Glu Gln			
2875	2880	2885	

acc acc gat ggc gtt ccc ctg cag act cta gtg gaa tct ctt cag gcc	9042
Thr Thr Asp Gly Val Pro Leu Gln Thr Leu Val Glu Ser Leu Gln Ala	
2890	2895
	2900
	2905
tac tta aga aac gca gct atg gga ctg gaa gaa gaa aca cat gct cat	9090
Tyr Leu Arg Asn Ala Ala Met Gly Leu Glu Glu Glu Thr His Ala His	
	2910
	2915
	2920
tac atc gat gtt gcc aga cta cta cat gct cag tac ggt gaa tta atc	9138
Tyr Ile Asp Val Ala Arg Leu Leu His Ala Gln Tyr Gly Glu Leu Ile	
	2925
	2930
	2935
caa ccg aga aat ggt tca gtt gat gaa aca ccc aaa atg tca gct ggc	9186
Gln Pro Arg Asn Gly Ser Val Asp Glu Thr Pro Lys Met Ser Ala Gly	
	2940
	2945
	2950
cag atg ctt ttg gta gca ttc gat ggc atg ttt gct caa gtt gaa act	9234
Gln Met Leu Leu Val Ala Phe Asp Gly Met Phe Ala Gln Val Glu Thr	
	2955
	2960
	2965
gct ttc agc tta tta gtt gaa aag ttg aac aag atg gaa att ccc ata	9282
Ala Phe Ser Leu Leu Val Glu Lys Leu Asn Lys Met Glu Ile Pro Ile	
	2970
	2975
	2980
	2985
gct tgg cga aag att gac atc ata agg gaa gcc agg agt act caa gtt	9330
Ala Trp Arg Lys Ile Asp Ile Ile Arg Glu Ala Arg Ser Thr Gln Val	
	2990
	2995
	3000

aat ttt ttt gat gat gat aat cac cgg cag gtg cta gaa gag att ttc 9378
 Asn Phe Phe Asp Asp Asp Asn His Arg Gln Val Leu Glu Glu Ile Phe
 3005 3010 3015

ttt cta aaa aga cta cag act att aag gag ttc ttc agg ctc tgt ggt 9426
 Phe Leu Lys Arg Leu Gln Thr Ile Lys Glu Phe Phe Arg Leu Cys Gly
 3020 3025 3030

acc ttt tct aaa aca ttg tca gga tca agt tca ctt gaa gat cag aat 9474
 Thr Phe Ser Lys Thr Leu Ser Gly Ser Ser Ser Leu Glu Asp Gln Asn
 3035 3040 3045

act gtg aat ggg cct gta cag att gtc aat gtg aaa acc ctt ttt aga 9522
 Thr Val Asn Gly Pro Val Gln Ile Val Asn Val Lys Thr Leu Phe Arg
 3050 3055 3060 3065

aac tct tgt ttc agt gaa gac caa atg gcc aaa cct atc aag gca ttc 9570
 Asn Ser Cys Phe Ser Glu Asp Gln Met Ala Lys Pro Ile Lys Ala Phe
 3070 3075 3080

aca gct gac ttt gtg agg cag ctc ttg ata ggg cta ccc aac caa gcc 9618
 Thr Ala Asp Phe Val Arg Gln Leu Leu Ile Gly Leu Pro Asn Gln Ala
 3085 3090 3095

ctc gga ctc aca ctg tgc agt ttt atc agt gct ctg ggt gta gac atc 9666
 Leu Gly Leu Thr Leu Cys Ser Phe Ile Ser Ala Leu Gly Val Asp Ile
 3100 3105 3110

att gct caa gta gag gca aag gac ttt ggt gcc gaa agc aaa gtt tct 9714

85

3230	3235	3240	
gtt cag gag aag cta gct gca ctt gaa tca agt att gaa cag cga ctc			10098
Val Gln Glu Lys Leu Ala Ala Leu Glu Ser Ser Ile Glu Gln Arg Leu			
3245	3250	3255	
aag tgg gca ggt ggt gcc aac cct gca ttg gcc cct gta cta caa gat			10146
Lys Trp Ala Gly Gly Ala Asn Pro Ala Leu Ala Pro Val Leu Gln Asp			
3260	3265	3270	
ttt gaa gca acg ata gct gaa aga aga aat ctt gtc ctt aaa gag agc			10194
Phe Glu Ala Thr Ile Ala Glu Arg Arg Asn Leu Val Leu Lys Glu Ser			
3275	3280	3285	
caa aga gca agt cag gtc aca ttt ctc tgc agc aat atc att cat ttt			10242
Gln Arg Ala Ser Gln Val Thr Phe Leu Cys Ser Asn Ile Ile His Phe			
3290	3295	3300	3305
gaa agt tta cga aca aga act gca gaa gcc tta aac ctg gat gcg gcg			10290
Glu Ser Leu Arg Thr Arg Thr Ala Glu Ala Leu Asn Leu Asp Ala Ala			
3310	3315	3320	
tta ttt gaa cta atc aag cga tgt cag cag atg tgt tcg ttt gca tca			10338
Leu Phe Glu Leu Ile Lys Arg Cys Gln Gln Met Cys Ser Phe Ala Ser			
3325	3330	3335	
cag ttt aac agt tca gtg tct gag tta gag ctt cgt tta tta cag aga			10386
Gln Phe Asn Ser Ser Val Ser Glu Leu Glu Leu Arg Leu Leu Gln Arg			
3340	3345	3350	

gtg gac act ggt ctt gaa cat cct att ggc agc tct gaa tgg ctt ttg 10434
Val Asp Thr Gly Leu Glu His Pro Ile Gly Ser Ser Glu Trp Leu Leu

3355

3360

3365

tca gca cac aaa cag ttg acc cag gat atg tct act cag agg gca att 10482
Ser Ala His Lys Gln Leu Thr Gln Asp Met Ser Thr Gln Arg Ala Ile

3370

3375

3380

3385

cag aca gag aaa gag cag cag ata gaa acg gtc tgt gaa aca att cag 10530
Gln Thr Glu Lys Glu Gln Gln Ile Glu Thr Val Cys Glu Thr Ile Gln

3390

3395

3400

aat ctg gtt gat aat ata aag act gtg ctc act ggt cat aac cga cag 10578
Asn Leu Val Asp Asn Ile Lys Thr Val Leu Thr Gly His Asn Arg Gln

3405

3410

3415

ctt gga gat gtc aaa cat ctc ttg aaa gct atg gct aag gat gaa gaa 10626
Leu Gly Asp Val Lys His Leu Leu Lys Ala Met Ala Lys Asp Glu Glu

3420

3425

3430

gct gct ctg gca gat ggt gaa gat gtt ccc tat gag aac agt gtt agg 10674
Ala Ala Leu Ala Asp Gly Glu Asp Val Pro Tyr Glu Asn Ser Val Arg

3435

3440

3445

cag ttt ttg ggt gaa tat aaa tca tgg caa gac aac att caa aca gtt 10722
Gln Phe Leu Gly Glu Tyr Lys Ser Trp Gln Asp Asn Ile Gln Thr Val

3450

3455

3460

3465

cta ttt aca tta gtc cag gct atg ggt cag gtt cga agt caa gaa cac	10770
Leu Phe Thr Leu Val Gln Ala Met Gly Gln Val Arg Ser Gln Glu His	
3470 3475 3480	
gtt gaa atg ctc cag gaa atc act ccc acc ttg aaa gaa ctg aaa aca	10818
Val Glu Met Leu Gln Glu Ile Thr Pro Thr Leu Lys Glu Leu Lys Thr	
3485 3490 3495	
caa agt cag agt atc tat aat aat tta gtg agt ttt gca tca ccc tta	10866
Gln Ser Gln Ser Ile Tyr Asn Asn Leu Val Ser Phe Ala Ser Pro Leu	
3500 3505 3510	
gtc acc gat gca aca aat gaa tgt tcg agt cca acg tca tct gct act	10914
Val Thr Asp Ala Thr Asn Glu Cys Ser Ser Pro Thr Ser Ser Ala Thr	
3515 3520 3525	
tat cag cca tcc ttc gct gca gca gtc cgg agt aac act ggc cag aag	10962
Tyr Gln Pro Ser Phe Ala Ala Ala Val Arg Ser Asn Thr Gly Gln Lys	
3530 3535 3540 3545	
act cag cct gat gtc atg tca cag aat gct aga aag ctg atc cag aaa	11010
Thr Gln Pro Asp Val Met Ser Gln Asn Ala Arg Lys Leu Ile Gln Lys	
3550 3555 3560	
aat ctt gct aca tca gct gat act cca cca agc acc gtt cca gga act	11058
Asn Leu Ala Thr Ser Ala Asp Thr Pro Pro Ser Thr Val Pro Gly Thr	
3565 3570 3575	
ggc aag agt gtt gct tgt agt cct aaa aag gca gtc aga gac cct aaa	11106

Gly Lys Ser Val Ala Cys Ser Pro Lys Lys Ala Val Arg Asp Pro Lys

3580

3585

3590

act ggg aaa gcg gtg caa gag aga aac tcc tat gca gtg agt gtg tgg 11154

Thr Gly Lys Ala Val Gln Glu Arg Asn Ser Tyr Ala Val Ser Val Trp

3595

3600

3605

aag aga gtg aaa gcc aag tta gag ggc cga gat gtt gat ccg aat agg 11202

Lys Arg Val Lys Ala Lys Leu Glu Gly Arg Asp Val Asp Pro Asn Arg

3610

3615

3620

3625

agg atg tca gtt gct gaa cag gtt gac tat gtc att aag gaa gca act 11250

Arg Met Ser Val Ala Glu Gln Val Asp Tyr Val Ile Lys Glu Ala Thr

3630

3635

3640

aat cta gat aac ttg gct cag ctg tat gaa ggt tgg aca gcc tgg gtg 11298

Asn Leu Asp Asn Leu Ala Gln Leu Tyr Glu Gly Trp Thr Ala Trp Val

3645

3650

3655

tga atggcaagac agtagatgag tctgtttaag cgaggtcaga catccaccag 11351

aatcaactca gcctcaggca tccaaagcca caccacagtc ggtggtgatg caactggggg 11411

cttactctga ggaaacctag gaaatctcgg tgcactagga agtgaatccc gcaggacagc 11471

tgcactcagg gatacgccca acaccatggc ctgcaacccc aggggtcaagg gtgaaggaaa 11531

gcaaagctca ccgcctgaac acggagattg tctttctgcc acagaacagc agcagacgtg 11591

tcgggagggtt agctgcggaa agaaatcggg atgccgcgga gcacagagt atttgaact 11651

ccattccacc tgaccctgtg tgtacaatcc aggaaaaaaa caaacccac tcagaaacag 11711

agaaaactgg ggtcgcgaag aaatcacagc caaggaagat ttgatgcatt cagattctcg 11771

tgtaacactt gtigcttggc aacagtactg gttgggttga ccagtaagta gaaaaaggct 11831

aaaggctatg cgatatgaat ttcagaaatg gactgaaaat ggagagctat gtaacagata 11891

cactacagta gaagaactta ctctgaaat gaaggaaaa aaaccacccc atcgttccct 11951

actcctcccc accacttacc cgttccccct ttacctaatc tagtagatta gccatctttc 12011

aaattcactt ttatttcagt ccttatattt catatacttc cgtctcgatg ctgttaacaa 12071

ctctgataa catggaaaat tcaaggattg tttaaaggtc tgatgatcac acacaaaatg 12131

taattccggt tatttaagtc atttctgtga ttctatcatg tacagtttcc agaattgtca 12191

ctgtgcattc aaaagtaatg aatctaacag acatttgatt taatgtacac tcccttttgc 12251

ttatagtgtg catTTTTTTT ggaggtcatt caaatTTTcc ctcttctgtg atagctgtag 12311

tttctttcat agaaagtagc taatccagtg taatctttta cttttttaaa aaccaagata 12371

gagtatctat tagagtttta cattgttgat gatagattaa caataaagtg atgttctggt 12431

ggaggtagac tgaaatTTTT ttaattcatg tttttcattt gatactttta atttacactt 12491
 agtaaattaa aagttgttta atttacttgg catTTtagga catgtacatg aaacagtga 12551
 aatgagatcc accaacaTct tttattaagt tcagttatta gtctgtgaag tgctttactt 12611
 tttgcacaat tttaatagct tgctattcag taatacatta tagtgaattc atgatcaagg 12671
 tttccTtaaa tttagcattg catttcagta ctgactgtgt aagctaaatt gctgatccaa 12731
 aataaaaacc cagactagaa tagggTtctt aaaatcaagt atcaatacaa aatagaacac 12791
 aattaaaatc ttaattgttg gctgggcaca gtggctcacg cctgtaatcc cagcactttg 12851
 ggaggccgag gcgggcggat catgaggTta ggagagcgag accatcctgg ctaacacggt 12911
 gaaaccccgT ctttactaaa atacaaaaaa aattagccgg gtgtgggtggc gggcgccTgt 12971
 agtcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatggcgt gaaccagga ggcggagctt 13031
 gcagtgagcc gagattgtgc cactgcactc cagcctgggc aacagagcta gactctgtgt 13091
 caaaaataaa tgactagat 13110

<210> 2

<211> 3657

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Arg Arg Ala Pro Gly Ser Arg Leu Ser Ser Gly Gly Thr Asn
 1 5 10 15
 Tyr Ser Arg Ser Trp Asn Asp Trp Gln Pro Arg Thr Asp Ser Ala Ser
 20 25 30
 Ala Asp Pro Gly Asn Leu Lys Tyr Ser Ser Ser Arg Asp Arg Gly Gly
 35 40 45
 Ser Ser Ser Tyr Gly Leu Gln Pro Ser Asn Ser Ala Val Val Ser Arg
 50 55 60
 Gln Arg His Asp Asp Thr Arg Val His Ala Asp Ile Gln Asn Asp Glu
 65 70 75 80
 Lys Gly Gly Tyr Ser Val Asn Gly Gly Ser Gly Glu Asn Thr Tyr Gly
 85 90 95
 Arg Lys Ser Leu Gly Gln Glu Leu Arg Val Asn Asn Val Thr Ser Pro
 100 105 110
 Glu Phe Thr Ser Val Gln His Gly Ser Arg Ala Leu Ala Thr Lys Asp
 115 120 125
 Met Arg Lys Ser Gln Glu Arg Ser Met Ser Tyr Ser Asp Glu Ser Arg
 130 135 140
 Leu Ser Asn Leu Leu Arg Arg Ile Thr Arg Glu Asp Asp Arg Asp Arg
 145 150 155 160
 Arg Leu Ala Thr Val Lys Gln Leu Lys Glu Phe Ile Gln Gln Pro Glu
 165 170 175
 Asn Lys Leu Val Leu Val Lys Gln Leu Asp Asn Ile Leu Ala Ala Val
 180 185 190
 His Asp Val Leu Asn Glu Ser Ser Lys Leu Leu Gln Glu Leu Arg Gln
 195 200 205
 Glu Gly Ala Cys Cys Leu Gly Leu Leu Cys Ala Ser Leu Ser Tyr Glu

210	215	220	
Ala Glu Lys Ile Phe Lys Trp Ile Phe Ser Lys Phe Ser Ser Ser Ala			
225	230	235	240
Lys Asp Glu Val Lys Leu Leu Tyr Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Ala Leu			
245	250	255	
Glu Thr Val Gly Glu Lys Lys Ala Phe Ser Ser Val Met Gln Leu Val			
260	265	270	
Met Thr Ser Leu Gln Ser Ile Leu Glu Asn Val Asp Thr Pro Glu Leu			
275	280	285	
Leu Cys Lys Cys Val Lys Cys Ile Leu Leu Val Ala Arg Cys Tyr Pro			
290	295	300	
His Ile Phe Ser Thr Asn Phe Arg Asp Thr Val Asp Ile Leu Val Gly			
305	310	315	320
Trp His Ile Asp His Thr Gln Lys Pro Ser Leu Thr Gln Gln Val Ser			
325	330	335	
Gly Trp Leu Gln Ser Leu Glu Pro Phe Trp Val Ala Asp Leu Ala Phe			
340	345	350	
Ser Thr Thr Leu Leu Gly Gln Phe Leu Glu Asp Met Glu Ala Tyr Ala			
355	360	365	
Glu Asp Leu Ser His Val Ala Ser Gly Glu Ser Val Asp Glu Asp Val			
370	375	380	
Pro Pro Pro Ser Val Ser Leu Pro Lys Leu Ala Ala Leu Leu Arg Val			
385	390	395	400
Phe Ser Thr Val Val Arg Ser Ile Gly Glu Arg Phe Ser Pro Ile Arg			
405	410	415	
Gly Pro Pro Ile Thr Glu Ala Tyr Val Thr Asp Val Leu Tyr Arg Val			
420	425	430	
Met Arg Cys Val Thr Ala Ala Asn Gln Val Phe Phe Ser Glu Ala Val			
435	440	445	

Leu Thr Ala Ala Asn Glu Cys Val Gly Val Leu Leu Gly Ser Leu Asp
 450 455 460
 Pro Ser Met Thr Ile His Cys Asp Met Val Ile Thr Tyr Gly Leu Asp
 465 470 475 480
 Gln Leu Glu Asn Cys Gln Thr Cys Gly Thr Asp Tyr Ile Ile Ser Val
 485 490 495
 Leu Asn Leu Leu Thr Leu Ile Val Glu Gln Ile Asn Thr Lys Leu Pro
 500 505 510
 Ser Ser Phe Val Glu Lys Leu Phe Ile Pro Ser Ser Lys Leu Leu Phe
 515 520 525
 Leu Arg Tyr His Lys Glu Lys Glu Val Val Ala Val Ala His Ala Val
 530 535 540
 Tyr Gln Ala Val Leu Ser Leu Lys Asn Ile Pro Val Leu Glu Thr Ala
 545 550 555 560
 Tyr Lys Leu Ile Leu Gly Glu Met Thr Cys Ala Leu Asn Asn Leu Leu
 565 570 575
 His Ser Leu Gln Leu Pro Glu Ala Cys Ser Glu Ile Lys His Glu Ala
 580 585 590
 Phe Lys Asn His Val Phe Asn Val Asp Asn Ala Lys Phe Val Val Lys
 595 600 605
 Phe Asp Leu Ser Ala Leu Thr Thr Ile Gly Asn Ala Lys Asn Ser Leu
 610 615 620
 Ile Gly Met Trp Ala Leu Ser Pro Thr Val Phe Ala Leu Leu Ser Lys
 625 630 635 640
 Asn Leu Met Ile Val His Ser Asp Leu Ala Val His Phe Pro Ala Ile
 645 650 655
 Gln Tyr Ala Val Leu Tyr Thr Leu Tyr Ser His Cys Thr Arg His Asp
 660 665 670
 His Phe Ile Ser Ser Ser Leu Ser Ser Ala Ser Pro Ser Leu Phe Asp

675	680	685
Gly Ala Val Ile Ser Thr Val Thr Thr Ala Thr Lys Lys His Phe Ser		
690	695	700
Ile Ile Leu Asn Leu Leu Gly Ile Leu Leu Lys Lys Asp Asn Leu Asn		
705	710	715
Gln Asp Thr Arg Lys Leu Leu Met Thr Trp Ala Leu Glu Ala Ala Val		
725	730	735
Leu Met Arg Lys Ser Glu Thr Tyr Ala Pro Leu Phe Ser Leu Pro Ser		
740	745	750
Phe His Lys Phe Cys Lys Gly Leu Leu Ala Asn Thr Leu Val Glu Asp		
755	760	765
Val Asn Ile Cys Leu Gln Ala Cys Ser Ser Leu His Ala Leu Ser Ser		
770	775	780
Ser Leu Pro Asp Asp Leu Leu Gln Arg Cys Val Asp Val Cys Arg Val		
785	790	795
Gln Leu Val His Ser Gly Thr Arg Ile Arg Gln Ala Phe Gly Lys Leu		
805	810	815
Leu Lys Ser Ile Pro Leu Asp Val Val Leu Ser Asn Asn Asn His Thr		
820	825	830
Glu Ile Gln Glu Ile Ser Leu Ala Leu Arg Ser His Met Ser Lys Ala		
835	840	845
Pro Ser Asn Thr Phe His Pro Gln Asp Phe Ser Asp Val Ile Ser Phe		
850	855	860
Ile Leu Tyr Gly Asn Ser His Arg Thr Gly Lys Asp Asn Trp Leu Glu		
865	870	875
Arg Leu Phe Tyr Ser Cys Gln Arg Leu Asp Lys Arg Asp Gln Ser Thr		
885	890	895
Ile Pro Arg Asn Leu Leu Lys Thr Asp Ala Val Leu Trp Gln Trp Ala		
900	905	910

Ile Trp Glu Ala Ala Gln Phe Thr Val Leu Ser Lys Leu Arg Thr Pro
 915 920 925
 Leu Gly Arg Ala Gln Asp Thr Phe Gln Thr Ile Glu Gly Ile Ile Arg
 930 935 940
 Ser Leu Ala Ala His Thr Leu Asn Pro Asp Gln Asp Val Ser Gln Trp
 945 950 955 960
 Thr Thr Ala Asp Asn Asp Glu Gly His Gly Asn Asn Gln Leu Arg Leu
 965 970 975
 Val Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Glu Asn Leu Glu Lys Leu Met Tyr Asn
 980 985 990
 Ala Tyr Glu Gly Cys Ala Asn Ala Leu Thr Ser Pro Pro Lys Val Ile
 995 1000 1005
 Arg Thr Phe Phe Tyr Thr Asn Arg Gln Thr Cys Gln Asp Trp Leu Thr
 1010 1015 1020
 Arg Ile Arg Leu Ser Ile Met Arg Val Gly Leu Leu Ala Gly Gln Pro
 1025 1030 1035 1040
 Ala Val Thr Val Arg His Gly Phe Asp Leu Leu Thr Glu Met Lys Thr
 1045 1050 1055
 Thr Ser Leu Ser Gln Gly Asn Glu Leu Glu Val Thr Ile Met Met Val
 1060 1065 1070
 Val Glu Ala Leu Cys Glu Leu His Cys Pro Glu Ala Ile Gln Gly Ile
 1075 1080 1085
 Ala Val Trp Ser Ser Ser Ile Val Gly Lys Asn Leu Leu Trp Ile Asn
 1090 1095 1100
 Ser Val Ala Gln Gln Ala Glu Gly Arg Phe Glu Lys Ala Ser Val Glu
 1105 1110 1115 1120
 Tyr Gln Glu His Leu Cys Ala Met Thr Gly Val Asp Cys Cys Ile Ser
 1125 1130 1135
 Ser Phe Asp Lys Ser Val Leu Thr Leu Ala Asn Ala Gly Arg Asn Ser

1140	1145	1150	
Ala Ser Pro Lys His Ser Leu Asn Gly Glu Ser Arg Lys Thr Val Leu			
1155	1160	1165	
Ser Lys Pro Thr Asp Ser Ser Pro Glu Val Ile Asn Tyr Leu Gly Asn			
1170	1175	1180	
Lys Ala Cys Glu Phe Tyr Ile Ser Ile Ala Asp Trp Ala Ala Val Gln			
1185	1190	1195	1200
Glu Trp Gln Asn Ala Ile His Asp Leu Lys Lys Ser Thr Ser Ser Thr			
1205	1210	1215	
Ser Leu Asn Leu Lys Ala Asp Phe Asn Tyr Ile Lys Ser Leu Ser Ser			
1220	1225	1230	
Phe Glu Ser Gly Lys Phe Val Glu Cys Thr Glu Gln Leu Glu Leu Leu			
1235	1240	1245	
Pro Gly Glu Asn Ile Asn Leu Leu Ala Gly Gly Ser Lys Glu Lys Ile			
1250	1255	1260	
Asp Met Lys Lys Leu Leu Pro Asn Met Leu Ser Pro Asp Pro Arg Glu			
1265	1270	1275	1280
Leu Gln Lys Ser Ile Glu Val Gln Leu Leu Arg Ser Ser Val Cys Leu			
1285	1290	1295	
Ala Thr Ala Leu Asn Pro Ile Glu Gln Asp Gln Lys Trp Gln Ser Ile			
1300	1305	1310	
Thr Glu Asn Val Val Lys Tyr Leu Lys Gln Thr Ser Arg Ile Ala Ile			
1315	1320	1325	
Gly Pro Leu Arg Leu Ser Thr Leu Thr Val Ser Gln Ser Leu Pro Val			
1330	1335	1340	
Leu Ser Thr Leu Gln Leu Tyr Cys Ser Ser Ala Leu Glu Asn Thr Val			
1345	1350	1355	1360
Ser Asn Arg Leu Ser Thr Glu Asp Cys Leu Ile Pro Leu Phe Ser Glu			
1365	1370	1375	

Ala Leu Arg Ser Cys Lys Gln His Asp Val Arg Pro Trp Met Gln Ala			
1380	1385	1390	
Leu Arg Tyr Thr Met Tyr Gln Asn Gln Leu Leu Glu Lys Ile Lys Glu			
1395	1400	1405	
Gln Thr Val Pro Ile Arg Ser His Leu Met Glu Leu Gly Leu Thr Ala			
1410	1415	1420	
Ala Lys Phe Ala Arg Lys Arg Gly Asn Val Ser Leu Ala Thr Arg Leu			
1425	1430	1435	1440
Leu Ala Gln Cys Ser Glu Val Gln Leu Gly Lys Thr Thr Thr Ala Gln			
1445	1450	1455	
Asp Leu Val Gln His Phe Lys Lys Leu Ser Thr Gln Gly Gln Val Asp			
1460	1465	1470	
Glu Lys Trp Gly Pro Glu Leu Asp Ile Glu Lys Thr Lys Leu Leu Tyr			
1475	1480	1485	
Thr Ala Gly Gln Ser Thr His Ala Met Glu Met Leu Ser Ser Cys Ala			
1490	1495	1500	
Ile Ser Phe Cys Lys Ser Val Lys Ala Glu Tyr Ala Val Ala Lys Ser			
1505	1510	1515	1520
Ile Leu Thr Leu Ala Lys Trp Ile Gln Ala Glu Trp Lys Glu Ile Ser			
1525	1530	1535	
Gly Gln Leu Lys Gln Val Tyr Arg Ala Gln His Gln Gln Asn Phe Thr			
1540	1545	1550	
Gly Leu Ser Thr Leu Ser Lys Asn Ile Leu Thr Leu Ile Glu Leu Pro			
1555	1560	1565	
Ser Val Asn Thr Met Glu Glu Glu Tyr Pro Arg Ile Glu Ser Glu Ser			
1570	1575	1580	
Thr Val His Ile Gly Val Gly Glu Pro Asp Phe Ile Leu Gly Gln Leu			
1585	1590	1595	1600
Tyr His Leu Ser Ser Val Gln Ala Pro Glu Val Ala Lys Ser Trp Ala			

1605	1610	1615	
Ala Leu Ala Ser Trp Ala Tyr Arg Trp Gly Arg Lys Val Val Asp Asn			
1620	1625	1630	
Ala Ser Gln Gly Glu Gly Val Arg Leu Leu Pro Arg Glu Lys Ser Glu			
1635	1640	1645	
Val Gln Asn Leu Leu Pro Asp Thr Ile Thr Glu Glu Glu Lys Glu Arg			
1650	1655	1660	
Ile Tyr Gly Ile Leu Gly Gln Ala Val Cys Arg Pro Ala Gly Ile Gln			
1665	1670	1675	1680
Asp Glu Asp Ile Thr Leu Gln Ile Thr Glu Ser Glu Asp Asn Glu Glu			
1685	1690	1695	
Asp Asp Met Val Asp Val Ile Trp Arg Gln Leu Ile Ser Ser Cys Pro			
1700	1705	1710	
Trp Leu Ser Glu Leu Asp Glu Ser Ala Thr Glu Gly Val Ile Lys Val			
1715	1720	1725	
Trp Arg Lys Val Val Asp Arg Ile Phe Ser Leu Tyr Lys Leu Ser Cys			
1730	1735	1740	
Ser Ala Tyr Phe Thr Phe Leu Lys Leu Asn Ala Gly Gln Ile Pro Leu			
1745	1750	1755	1760
Asp Glu Asp Asp Pro Arg Leu His Leu Ser His Arg Val Glu Gln Ser			
1765	1770	1775	
Thr Asp Asp Met Ile Val Met Ala Thr Leu Arg Leu Leu Arg Leu Leu			
1780	1785	1790	
Val Lys His Ala Gly Glu Leu Arg Gln Tyr Leu Glu His Gly Leu Glu			
1795	1800	1805	
Thr Thr Pro Thr Ala Pro Trp Arg Gly Ile Ile Pro Gln Leu Phe Ser			
1810	1815	1820	
Arg Leu Asn His Pro Glu Val Tyr Val Arg Gln Ser Ile Cys Asn Leu			
1825	1830	1835	1840

Leu Cys Arg Val Ala Gln Asp Ser Pro His Leu Ile Leu Tyr Pro Ala
 1845 1850 1855
 Ile Val Gly Thr Ile Ser Leu Ser Ser Glu Ser Gln Ala Ser Gly Asn
 1860 1865 1870
 Lys Phe Ser Thr Ala Ile Pro Thr Leu Leu Gly Asn Ile Gln Gly Glu
 1875 1880 1885
 Glu Leu Leu Val Ser Glu Cys Glu Gly Gly Ser Pro Pro Ala Ser Gln
 1890 1895 1900
 Asp Ser Asn Lys Asp Glu Pro Lys Ser Gly Leu Asn Glu Asp Gln Ala
 1905 1910 1915 1920
 Met Met Gln Asp Cys Tyr Ser Lys Ile Val Asp Lys Leu Ser Ser Ala
 1925 1930 1935
 Asn Pro Thr Met Val Leu Gln Val Gln Met Leu Val Ala Glu Leu Arg
 1940 1945 1950
 Arg Val Thr Val Leu Trp Asp Glu Leu Trp Leu Gly Val Leu Leu Gln
 1955 1960 1965
 Gln His Met Tyr Val Leu Arg Arg Ile Gln Gln Leu Glu Asp Glu Val
 1970 1975 1980
 Lys Arg Val Gln Asn Asn Asn Thr Leu Arg Lys Glu Glu Lys Ile Ala
 1985 1990 1995 2000
 Ile Met Arg Glu Arg His Thr Ala Leu Met Lys Pro Ile Val Phe Ala
 2005 2010 2015
 Leu Glu His Val Arg Ser Ile Thr Ala Ala Pro Ala Glu Thr Pro His
 2020 2025 2030
 Glu Lys Trp Phe Gln Asp Asn Tyr Gly Asp Ala Ile Glu Asn Ala Leu
 2035 2040 2045
 Glu Lys Leu Lys Thr Pro Leu Asn Pro Ala Lys Pro Gly Ser Ser Trp
 2050 2055 2060
 Ile Pro Phe Lys Glu Ile Met Leu Ser Leu Gln Gln Arg Ala Gln Lys

2065	2070	2075	2080
Arg Ala Ser Tyr Ile Leu Arg Leu Glu Glu Ile Ser Pro Trp Leu Ala			
2085	2090	2095	
Ala Met Thr Asn Thr Glu Ile Ala Leu Pro Gly Glu Val Ser Ala Arg			
2100	2105	2110	
Asp Thr Val Thr Ile His Ser Val Gly Gly Thr Ile Thr Ile Leu Pro			
2115	2120	2125	
Thr Lys Thr Lys Pro Lys Lys Leu Leu Phe Leu Gly Ser Asp Gly Lys			
2130	2135	2140	
Ser Tyr Pro Tyr Leu Phe Lys Gly Leu Glu Asp Leu His Leu Asp Glu			
2145	2150	2155	2160
Arg Ile Met Gln Phe Leu Ser Ile Val Asn Thr Met Phe Ala Thr Ile			
2165	2170	2175	
Asn Arg Gln Glu Thr Pro Arg Phe His Ala Arg His Tyr Ser Val Thr			
2180	2185	2190	
Pro Leu Gly Thr Arg Ser Gly Leu Ile Gln Trp Val Asp Gly Ala Thr			
2195	2200	2205	
Pro Leu Phe Gly Leu Tyr Lys Arg Trp Gln Gln Arg Glu Ala Ala Leu			
2210	2215	2220	
Gln Ala Gln Lys Ala Gln Asp Ser Tyr Gln Thr Pro Gln Asn Pro Gly			
2225	2230	2235	2240
Ile Val Pro Arg Pro Ser Glu Leu Tyr Tyr Ser Lys Ile Gly Pro Ala			
2245	2250	2255	
Leu Lys Thr Val Gly Leu Ser Leu Asp Val Ser Arg Arg Asp Trp Pro			
2260	2265	2270	
Leu His Val Met Lys Ala Val Leu Glu Glu Leu Met Glu Ala Thr Pro			
2275	2280	2285	
Pro Asn Leu Leu Ala Lys Glu Leu Trp Ser Ser Cys Thr Thr Pro Asp			
2290	2295	2300	

Glu Trp Trp Arg Val Thr Gln Ser Tyr Ala Arg Ser Thr Ala Val Met
 2305 2310 2315 2320
 Ser Met Val Gly Tyr Ile Ile Gly Leu Gly Asp Arg His Leu Asp Asn
 2325 2330 2335
 Val Leu Ile Asp Met Thr Thr Gly Glu Val Val His Ile Asp Tyr Asn
 2340 2345 2350
 Val Cys Phe Glu Lys Gly Lys Ser Leu Arg Val Pro Glu Lys Val Pro
 2355 2360 2365
 Phe Arg Met Thr Gln Asn Ile Glu Thr Ala Leu Gly Val Thr Gly Val
 2370 2375 2380
 Glu Gly Val Phe Arg Leu Ser Cys Glu Gln Val Leu His Ile Met Arg
 2385 2390 2395 2400
 Arg Gly Arg Glu Thr Leu Leu Thr Leu Leu Glu Ala Phe Val Tyr Asp
 2405 2410 2415
 Pro Leu Val Asp Trp Thr Ala Gly Gly Glu Ala Gly Phe Ala Gly Ala
 2420 2425 2430
 Val Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Gln Ala Glu Ser Lys Gln Ser Lys Arg
 2435 2440 2445
 Glu Met Glu Arg Glu Ile Thr Arg Ser Leu Phe Ser Ser Arg Val Ala
 2450 2455 2460
 Glu Ile Lys Val Asn Trp Phe Lys Asn Arg Asp Glu Met Leu Val Val
 2465 2470 2475 2480
 Leu Pro Lys Leu Asp Gly Ser Leu Asp Glu Tyr Leu Ser Leu Gln Glu
 2485 2490 2495
 Gln Leu Thr Asp Val Glu Lys Leu Gln Gly Lys Leu Leu Glu Glu Ile
 2500 2505 2510
 Glu Phe Leu Glu Gly Ala Glu Gly Val Asp His Pro Ser His Thr Leu
 2515 2520 2525
 Gln His Arg Tyr Ser Glu His Thr Gln Leu Gln Thr Gln Gln Arg Ala

2530	2535	2540	
Val Gln Glu Ala Ile Gln Val Lys Leu Asn Glu Phe Glu Gln Trp Ile			
2545	2550	2555	2560
Thr His Tyr Gln Ala Ala Phe Asn Asn Leu Glu Ala Thr Gln Leu Ala			
2565	2570	2575	
Ser Leu Leu Gln Glu Ile Ser Thr Gln Met Asp Leu Gly Pro Pro Ser			
2580	2585	2590	
Tyr Val Pro Ala Thr Ala Phe Leu Gln Asn Ala Gly Gln Ala His Leu			
2595	2600	2605	
Ile Ser Gln Cys Glu Gln Leu Glu Gly Glu Val Gly Ala Leu Leu Gln			
2610	2615	2620	
Gln Arg Arg Ser Val Leu Arg Gly Cys Leu Glu Gln Leu His His Tyr			
2625	2630	2635	2640
Ala Thr Val Ala Leu Gln Tyr Pro Lys Ala Ile Phe Gln Lys His Arg			
2645	2650	2655	
Ile Glu Gln Trp Lys Thr Trp Met Glu Glu Leu Ile Cys Asn Thr Thr			
2660	2665	2670	
Val Glu Arg Cys Gln Glu Leu Tyr Arg Lys Tyr Glu Met Gln Tyr Ala			
2675	2680	2685	
Pro Gln Pro Pro Pro Thr Val Cys Gln Phe Ile Thr Ala Thr Glu Met			
2690	2695	2700	
Thr Leu Gln Arg Tyr Ala Ala Asp Ile Asn Ser Arg Leu Ile Arg Gln			
2705	2710	2715	2720
Val Glu Arg Leu Lys Gln Glu Ala Val Thr Val Pro Val Cys Glu Asp			
2725	2730	2735	
Gln Leu Lys Glu Ile Glu Arg Cys Ile Lys Val Phe Leu His Glu Asn			
2740	2745	2750	
Gly Glu Glu Gly Ser Leu Ser Leu Ala Ser Val Ile Ile Ser Ala Leu			
2755	2760	2765	

Cys Thr Leu Thr Arg Arg Asn Leu Met Met Glu Gly Ala Ala Ser Ser			
2770	2775	2780	
Ala Gly Glu Gln Leu Val Asp Leu Thr Ser Arg Asp Gly Ala Trp Phe			
2785	2790	2795	2800
Leu Glu Glu Leu Cys Ser Met Ser Gly Asn Val Thr Cys Leu Val Gln			
2805	2810	2815	
Leu Leu Lys Gln Cys His Leu Val Pro Gln Asp Leu Asp Ile Pro Asn			
2820	2825	2830	
Pro Met Glu Ala Ser Glu Thr Val His Leu Ala Asn Gly Val Tyr Thr			
2835	2840	2845	
Ser Leu Gln Glu Leu Asn Ser Asn Phe Arg Gln Ile Ile Phe Pro Glu			
2850	2855	2860	
Ala Leu Arg Cys Leu Met Lys Gly Glu Tyr Thr Leu Glu Ser Met Leu			
2865	2870	2875	2880
His Glu Leu Asp Gly Leu Ile Glu Gln Thr Thr Asp Gly Val Pro Leu			
2885	2890	2895	
Gln Thr Leu Val Glu Ser Leu Gln Ala Tyr Leu Arg Asn Ala Ala Met			
2900	2905	2910	
Gly Leu Glu Glu Glu Thr His Ala His Tyr Ile Asp Val Ala Arg Leu			
2915	2920	2925	
Leu His Ala Gln Tyr Gly Glu Leu Ile Gln Pro Arg Asn Gly Ser Val			
2930	2935	2940	
Asp Glu Thr Pro Lys Met Ser Ala Gly Gln Met Leu Leu Val Ala Phe			
2945	2950	2955	2960
Asp Gly Met Phe Ala Gln Val Glu Thr Ala Phe Ser Leu Leu Val Glu			
2965	2970	2975	
Lys Leu Asn Lys Met Glu Ile Pro Ile Ala Trp Arg Lys Ile Asp Ile			
2980	2985	2990	
Ile Arg Glu Ala Arg Ser Thr Gln Val Asn Phe Phe Asp Asp Asp Asn			

2995	3000	3005	
His Arg Gln Val Leu Glu Glu Ile Phe Phe Leu Lys Arg Leu Gln Thr			
3010	3015	3020	
Ile Lys Glu Phe Phe Arg Leu Cys Gly Thr Phe Ser Lys Thr Leu Ser			
3025	3030	3035	3040
Gly Ser Ser Ser Leu Glu Asp Gln Asn Thr Val Asn Gly Pro Val Gln			
3045	3050	3055	
Ile Val Asn Val Lys Thr Leu Phe Arg Asn Ser Cys Phe Ser Glu Asp			
3060	3065	3070	
Gln Met Ala Lys Pro Ile Lys Ala Phe Thr Ala Asp Phe Val Arg Gln			
3075	3080	3085	
Leu Leu Ile Gly Leu Pro Asn Gln Ala Leu Gly Leu Thr Leu Cys Ser			
3090	3095	3100	
Phe Ile Ser Ala Leu Gly Val Asp Ile Ile Ala Gln Val Glu Ala Lys			
3105	3110	3115	3120
Asp Phe Gly Ala Glu Ser Lys Val Ser Val Asp Asp Leu Cys Lys Lys			
3125	3130	3135	
Ala Val Glu His Asn Ile Gln Ile Gly Lys Phe Ser Gln Leu Val Met			
3140	3145	3150	
Asn Arg Ala Thr Val Leu Ala Ser Ser Tyr Asp Thr Ala Trp Lys Lys			
3155	3160	3165	
His Asp Leu Val Arg Arg Leu Glu Thr Ser Ile Ser Ser Cys Lys Thr			
3170	3175	3180	
Ser Leu Gln Arg Val Gln Leu His Ile Ala Met Phe Gln Trp Gln His			
3185	3190	3195	3200
Glu Asp Leu Leu Ile Asn Arg Pro Gln Ala Met Ser Val Thr Pro Pro			
3205	3210	3215	
Pro Arg Ser Ala Ile Leu Thr Ser Met Lys Lys Lys Leu His Thr Leu			
3220	3225	3230	

Ser Gln Ile Glu Thr Ser Ile Ala Thr Val Gln Glu Lys Leu Ala Ala			
3235	3240	3245	
Leu Glu Ser Ser Ile Glu Gln Arg Leu Lys Trp Ala Gly Gly Ala Asn			
3250	3255	3260	
Pro Ala Leu Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe Glu Ala Thr Ile Ala Glu			
3265	3270	3275	3280
Arg Arg Asn Leu Val Leu Lys Glu Ser Gln Arg Ala Ser Gln Val Thr			
3285	3290	3295	
Phe Leu Cys Ser Asn Ile Ile His Phe Glu Ser Leu Arg Thr Arg Thr			
3300	3305	3310	
Ala Glu Ala Leu Asn Leu Asp Ala Ala Leu Phe Glu Leu Ile Lys Arg			
3315	3320	3325	
Cys Gln Gln Met Cys Ser Phe Ala Ser Gln Phe Asn Ser Ser Val Ser			
3330	3335	3340	
Glu Leu Glu Leu Arg Leu Leu Gln Arg Val Asp Thr Gly Leu Glu His			
3345	3350	3355	3360
Pro Ile Gly Ser Ser Glu Trp Leu Leu Ser Ala His Lys Gln Leu Thr			
3365	3370	3375	
Gln Asp Met Ser Thr Gln Arg Ala Ile Gln Thr Glu Lys Glu Gln Gln			
3380	3385	3390	
Ile Glu Thr Val Cys Glu Thr Ile Gln Asn Leu Val Asp Asn Ile Lys			
3395	3400	3405	
Thr Val Leu Thr Gly His Asn Arg Gln Leu Gly Asp Val Lys His Leu			
3410	3415	3420	
Leu Lys Ala Met Ala Lys Asp Glu Glu Ala Ala Leu Ala Asp Gly Glu			
3425	3430	3435	3440
Asp Val Pro Tyr Glu Asn Ser Val Arg Gln Phe Leu Gly Glu Tyr Lys			
3445	3450	3455	
Ser Trp Gln Asp Asn Ile Gln Thr Val Leu Phe Thr Leu Val Gln Ala			

3460	3465	3470
Met Gly Gln Val Arg Ser Gln Glu His Val Glu Met Leu Gln Glu Ile		
3475	3480	3485
Thr Pro Thr Leu Lys Glu Leu Lys Thr Gln Ser Gln Ser Ile Tyr Asn		
3490	3495	3500
Asn Leu Val Ser Phe Ala Ser Pro Leu Val Thr Asp Ala Thr Asn Glu		
3505	3510	3515
Cys Ser Ser Pro Thr Ser Ser Ala Thr Tyr Gln Pro Ser Phe Ala Ala		
3525	3530	3535
Ala Val Arg Ser Asn Thr Gly Gln Lys Thr Gln Pro Asp Val Met Ser		
3540	3545	3550
Gln Asn Ala Arg Lys Leu Ile Gln Lys Asn Leu Ala Thr Ser Ala Asp		
3555	3560	3565
Thr Pro Pro Ser Thr Val Pro Gly Thr Gly Lys Ser Val Ala Cys Ser		
3570	3575	3580
Pro Lys Lys Ala Val Arg Asp Pro Lys Thr Gly Lys Ala Val Gln Glu		
3585	3590	3595
Arg Asn Ser Tyr Ala Val Ser Val Trp Lys Arg Val Lys Ala Lys Leu		
3605	3610	3615
Glu Gly Arg Asp Val Asp Pro Asn Arg Arg Met Ser Val Ala Glu Gln		
3620	3625	3630
Val Asp Tyr Val Ile Lys Glu Ala Thr Asn Leu Asp Asn Leu Ala Gln		
3635	3640	3645
Leu Tyr Glu Gly Trp Thr Ala Trp Val		
3650	3655	

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

agcgttatgt ttggtggaag aa

22

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gcagctgtca acacagcctc

20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gatgtgtcga tgtttgccg

19

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

ttagcacatc cctcgtatgc a

21

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Cys Asp Asn Leu Ala Gln Leu Tyr Glu Gly Trp Thr Ala Trp Val

1

5

10

15

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: A His tag
sequence containing six histidine residues

<400> 8

Met Arg Gly Ser His His His His His

1

5

10

【図面の簡単な説明】

【図1】

実施例1で得られた各cDNAクローンと、それから得られた新規塩基配列及びオープンリーディングフレームとの関係を示す説明図である。

【図2】

本発明のヒトSMG-1と公知タンパク質とを比較した結果を示す説明図である。

【図3】

各種ヒトセルラインにおけるヒトSMG-1のmRNAを検出するオートラジオグラフィの結果を示す、図面に代わる写真である。

【図4】

ヒトSMG-1に対する抗体を作製するのに用いた各抗原部位を示す説明図である。

【図5】

HeLa細胞溶解物について、ウエスタンブロット法を実施した結果を示す、図面に代わる写真である。

【図6】

各種動物細胞溶解物について、ウエスタンブロット法を実施した結果を示す、図面に代わる写真である。

【図7】

各種動物組織由来の細胞溶解物について、ウエスタンブロット法を実施した結果を示す、図面に代わる写真である。

【図8】

HeLa細胞溶解物由来の免疫沈降物について、ウエスタンブロット法を実施した結果と、プロテインキナーゼ活性を確認した結果とを示す、図面に代わる写真である。

【図9】

6H-hSMG-1及び6H-hSMG-1(DA)の発現と、イン・ビトロ
プロテインキナーゼ活性の確認とを実施した結果を示す、図面に代わる写真であ
る。

【図10】

レポーター遺伝子プラスミドの構造を模式的に示す説明図である。

【図11】

レポーターmRNA蓄積量をノーザンブロット法により評価した結果を示す、
図面に代わる写真である。

【図12】

6H-hSMG-1及び6H-hSMG-1(DA)のレポーターmRNA蓄
積に与える影響を確認した結果を示す、図面に代わる写真である。

【図13】

6H-hSMG-1及び6H-hSMG-1(DA)のレポーターmRNA蓄
積に与える影響を確認した結果を示す、グラフである。

【図14】

レポーターmRNAとしてBGG-WTを用いた場合の、ドキシサイクリン存
在下における6H-hSMG-1及び6H-hSMG-1(DA)のレポーター
mRNA蓄積に与える影響を確認した結果を示す、図面に代わる写真である。

【図15】

図14に示す結果をグラフ化した結果を示す、グラフである。

【図16】

レポーターmRNAとしてBGG-39PTCを用いた場合の、ドキシサイク
リン存在下における6H-hSMG-1及び6H-hSMG-1(DA)のレポ
ーターmRNA蓄積に与える影響を確認した結果を示す、図面に代わる写真であ
る。

【図17】

図14に示す結果をグラフ化した結果を示す、グラフである。

【図18】

全長hUpf1/SMG-2融合タンパク質の6H-hSMG-1によるリン酸化を確認した結果を示す、図面に代わる写真である。

【図19】

実施例9(2)で使用了hUpf1/SMG-2部分断片の構造を模式的に示す、説明図である。

【図20】

hUpf1/SMG-2部分断片の融合タンパク質における6H-hSMG-1によるリン酸化を確認した結果を示す、図面に代わる写真である。

【図21】

実施例9(3)で使用了hUpf1/SMG-2部分ペプチドの構造を模式的に示す、説明図である。

【図22】

hUpf1/SMG-2部分ペプチドの融合タンパク質における6H-hSMG-1によるリン酸化を確認した結果を示す、図面に代わる写真である。

【図23】

イン・ピボにおいて、オカダ酸存在下でのhUpf1/SMG-2のリン酸化を確認した結果を示す、図面に代わる写真である。

【図24】

アルカリホスファターゼを用いて、イン・ピボにおけるhUpf1/SMG-2のリン酸化を確認した結果を示す、図面に代わる写真である。

【図25】

6H-hSMG-1又は6H-hSMG-1(DA)を過剰発現した場合の、HA-hUpf1/SMG-2のリン酸化を確認した結果を示す、図面に代わる写真である。

【図26】

6H-hSMG-1のキナーゼ活性における、ウォートマンニンの阻害効果を示す、グラフである。

【図27】

6H-hSMG-1のキナーゼ活性における、カフェインの阻害効果を示す、

グラフである。

【図28】

SMG-1阻害剤が、hUpf1/SMG-2のリン酸化を細胞内で抑制することを確認した結果を示す、図面に代わる写真である。

【図29】

SMG-1阻害剤により、内因性のPTC含有BGG遺伝子産物が安定化されることを示す、図面に代わる写真である。

【図30】

p53遺伝子の構造並びにセルラインcalu6及びN417中のPTC変異を模式的に示す、説明図である。

【図31】

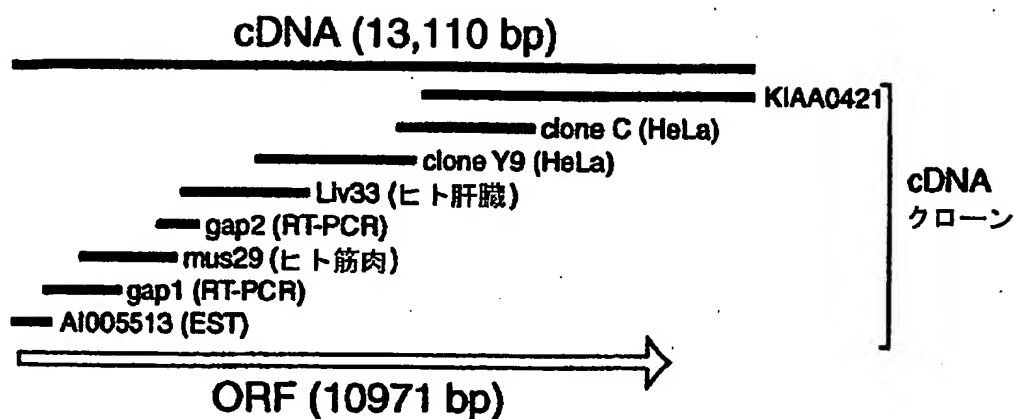
SMG-1阻害剤（ウォートマンニン）により、内因性のPTCp53遺伝子産物が安定化されることを示す、図面に代わる写真である。

【図32】

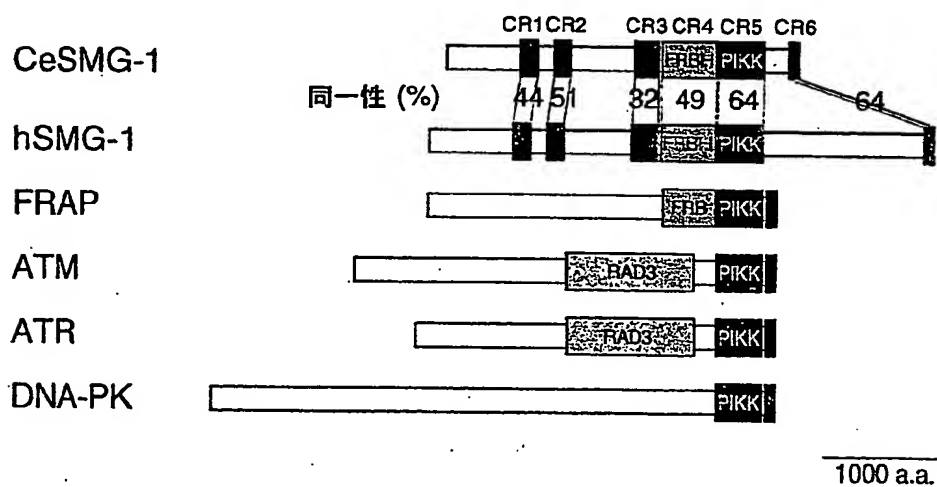
種々濃度のSMG-1阻害剤（ウォートマンニン又はカフェイン）により、内因性のPTCp53遺伝子産物が安定化されることを示す、図面に代わる写真である。

【書類名】 図面

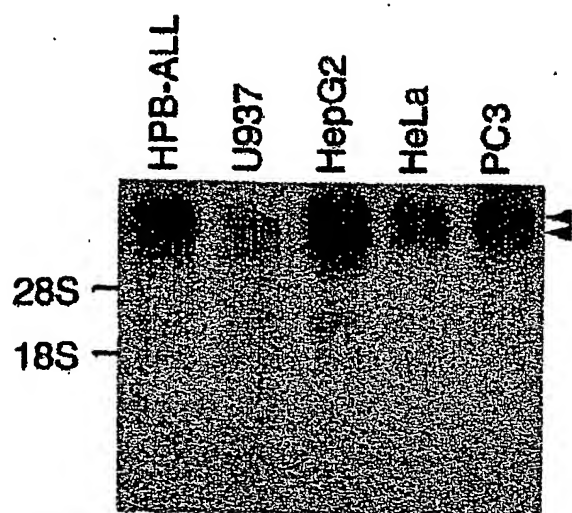
【図1】



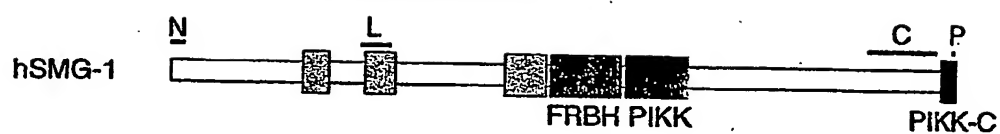
【図2】



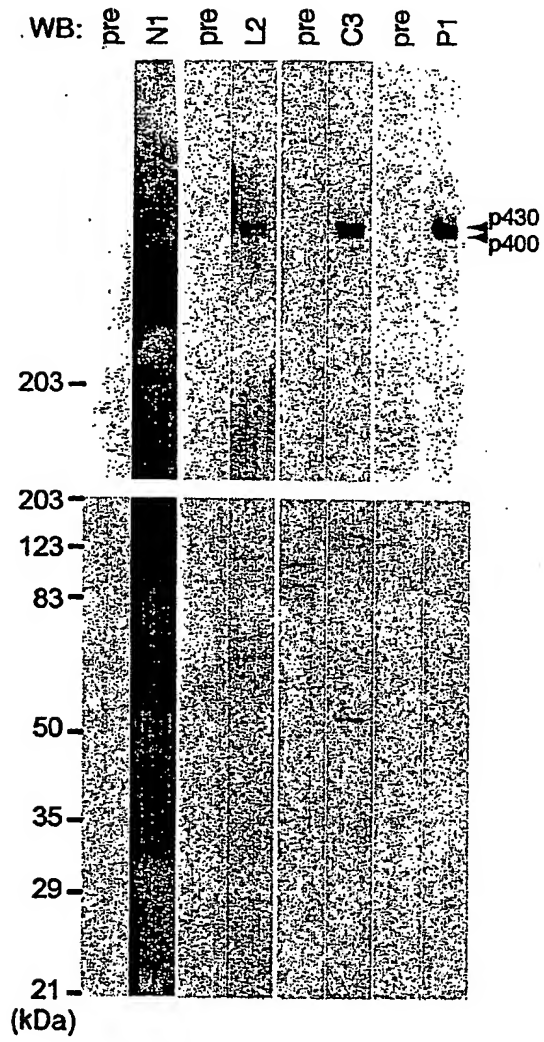
【図3】



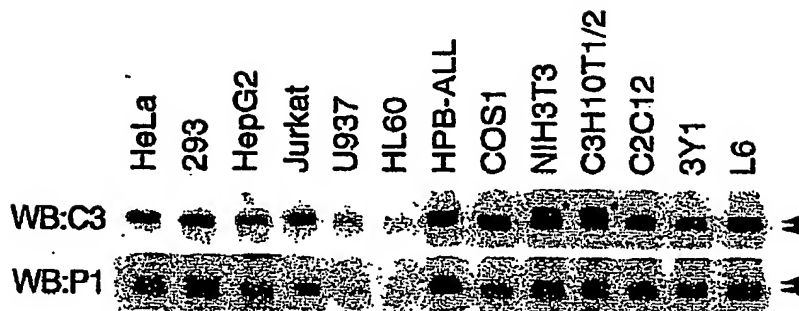
【図4】



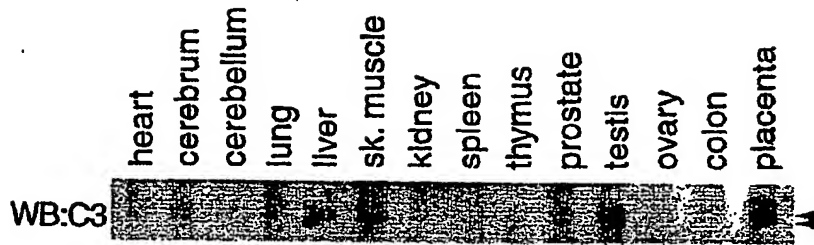
【図5】



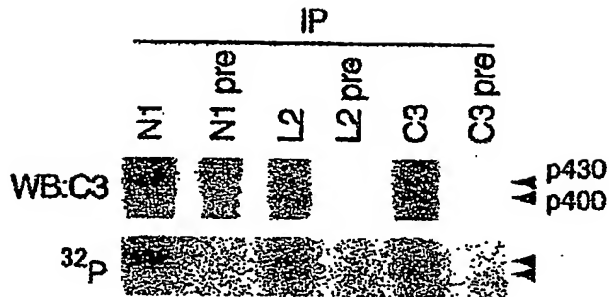
【図6】



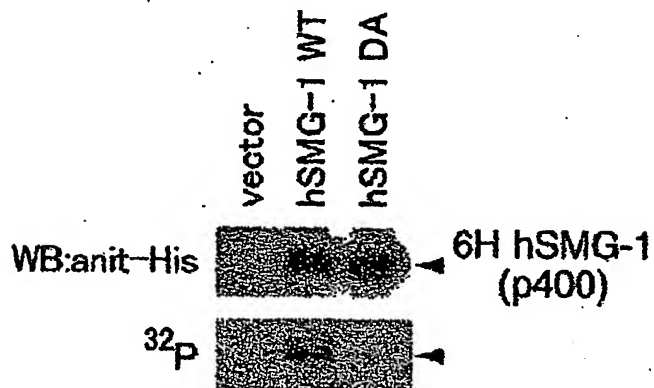
【図7】



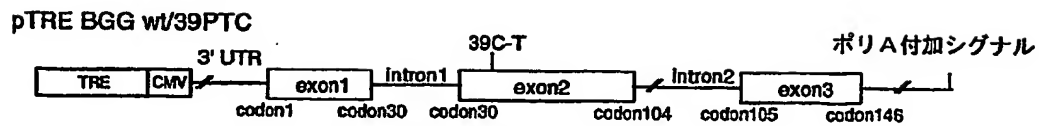
【図8】



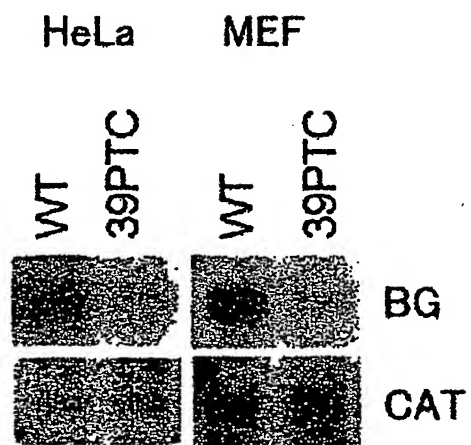
【図9】



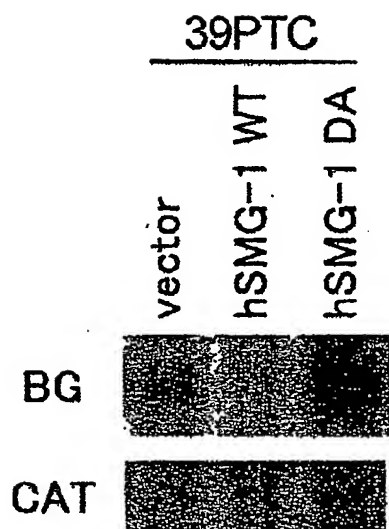
【図10】



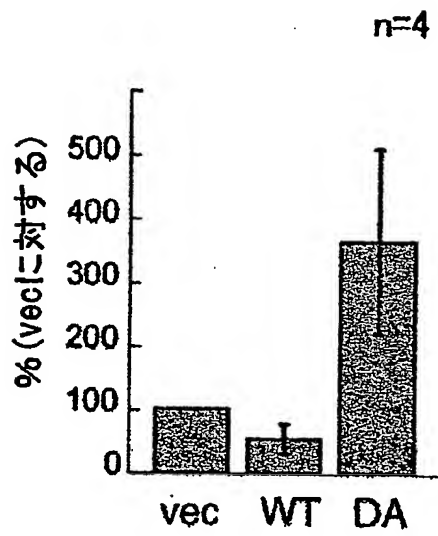
【図11】



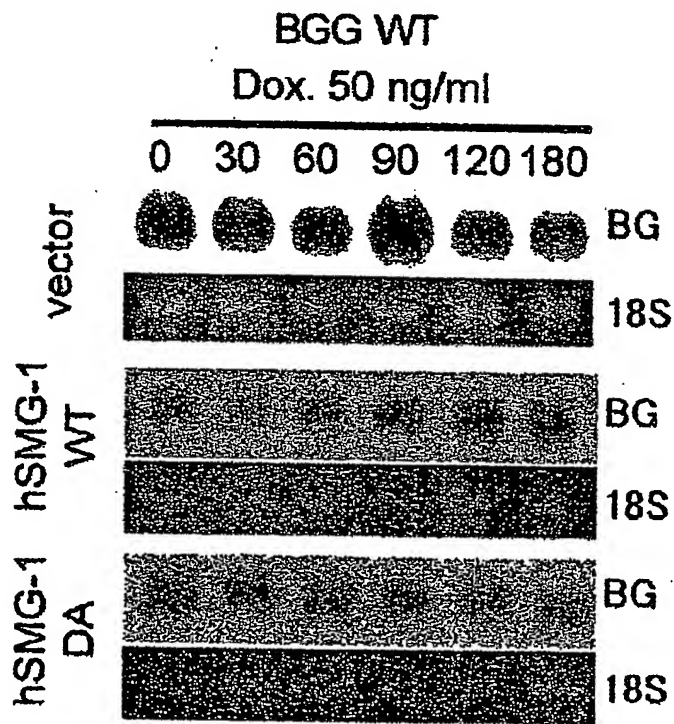
【図12】



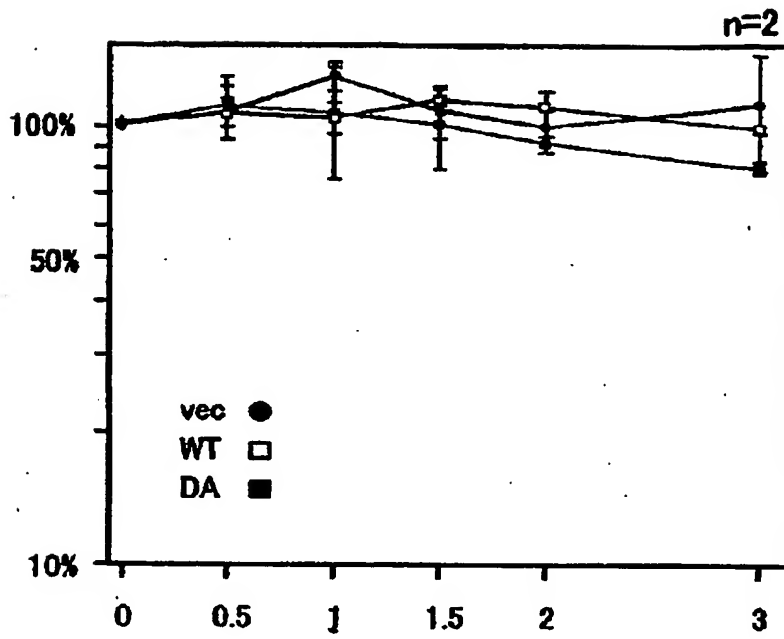
【図13】



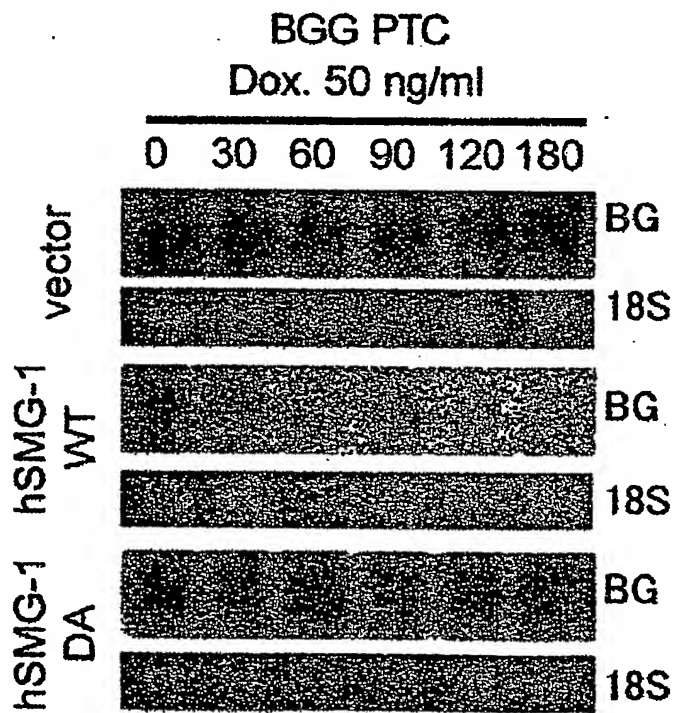
【図14】



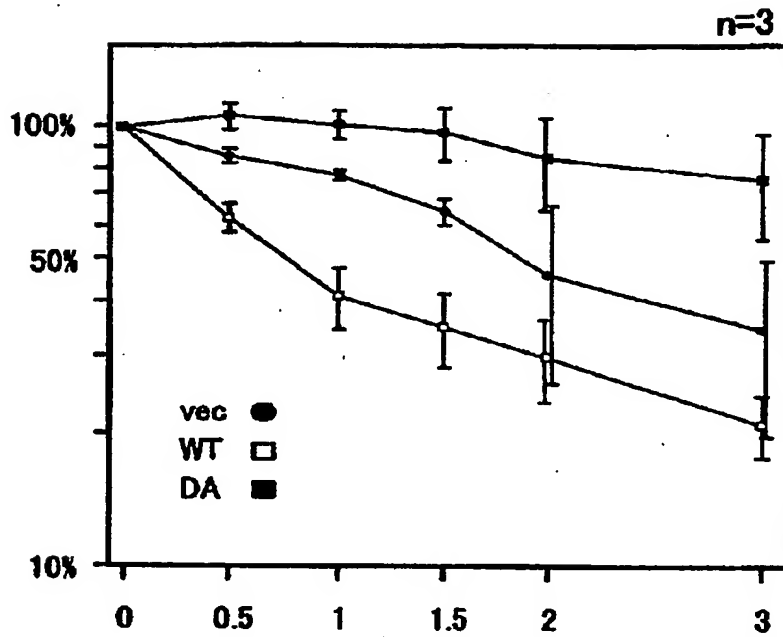
【図15】



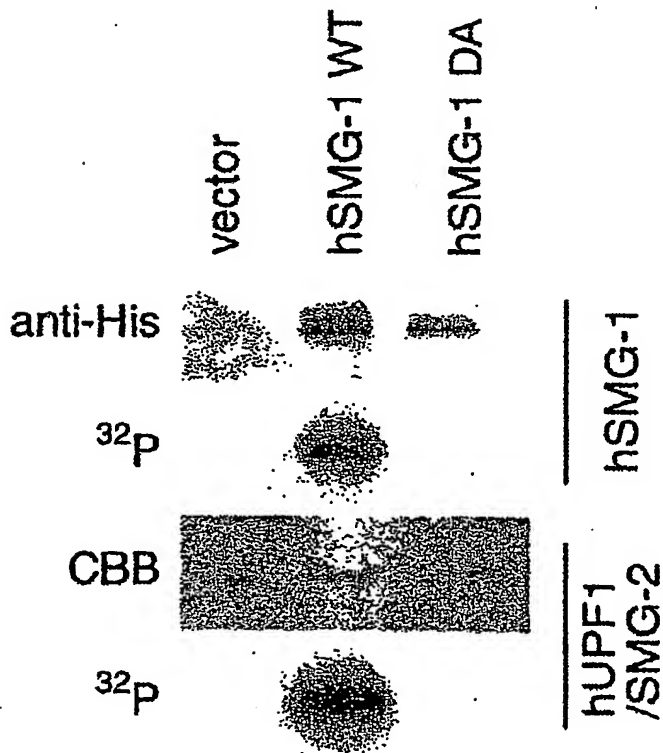
【図16】



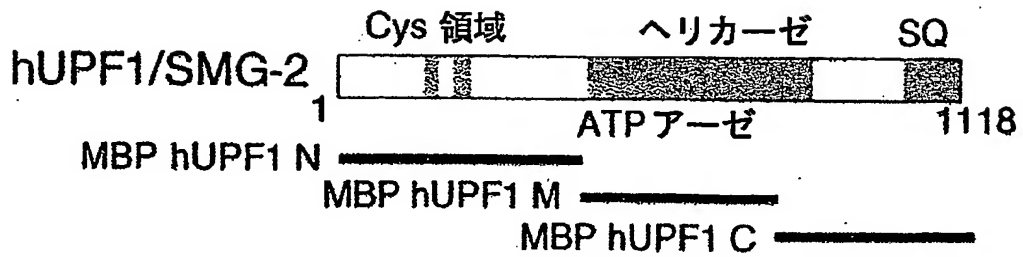
【図17】



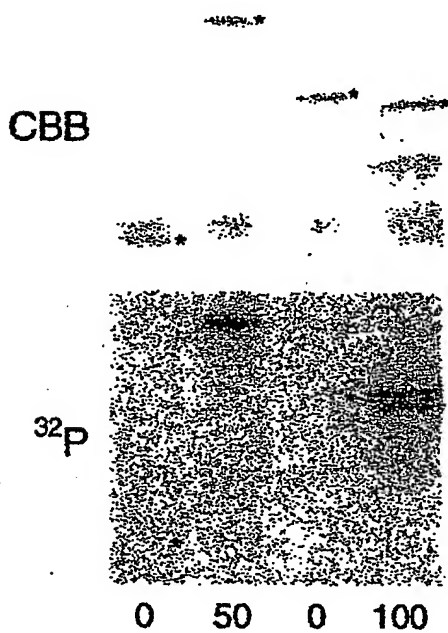
【図18】



【図19】



【図20】

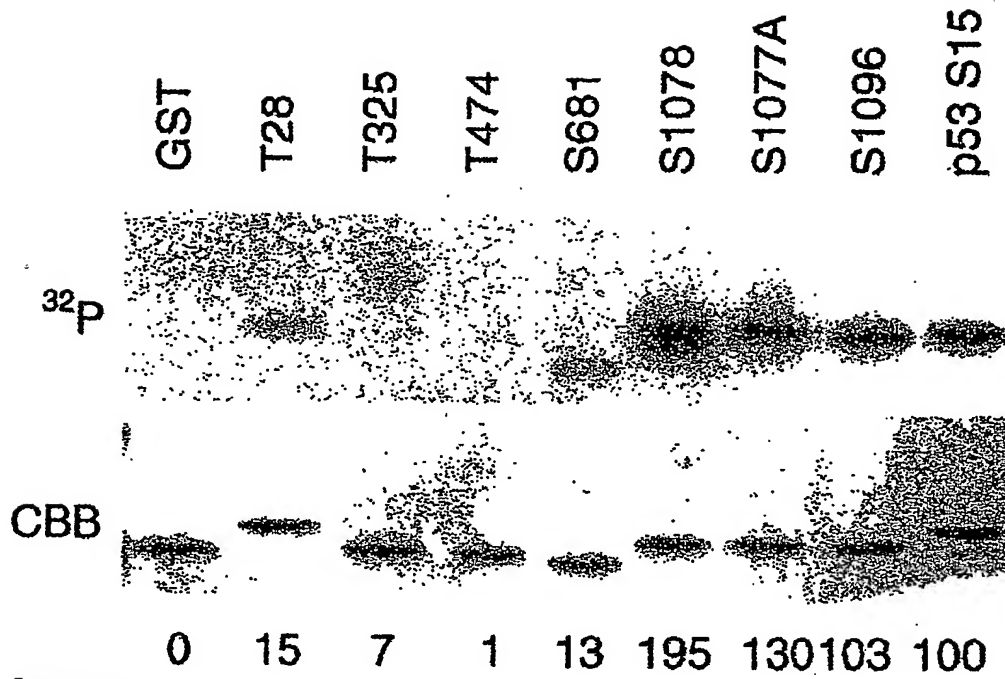


【図21】

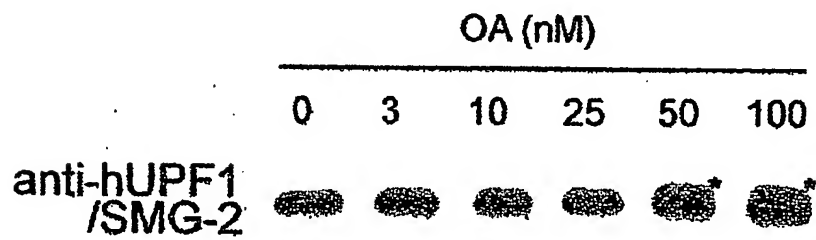
hUPF1/SMG-2 ペプチド

T28	E	L	L	G	A	D	T	G	G	S	E	F	E	F
T325	K	L	K	E	S	Q	T	D	N	I	T	V	R	
S474	L	P	D	L	N	H	S	V	Y	A	V	K	T	
S681	A	A	K	A	G	L	S	S	L	F	E	R	L	
S1078	L	S	G	P	E	L	S	D	S	Y	L	G	D	
S1096	Q	I	D	V	A	L	S	D	S	T	Y	Q	G	
p53 S15	S	V	E	P	P	L	S	E	T	F	S	D	L	

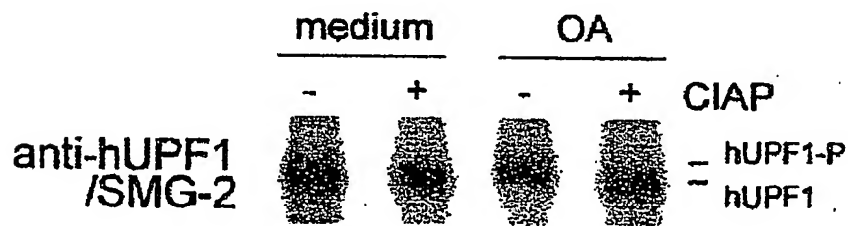
【図22】



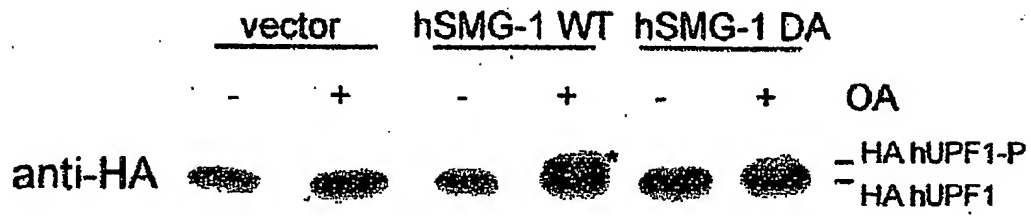
【図23】



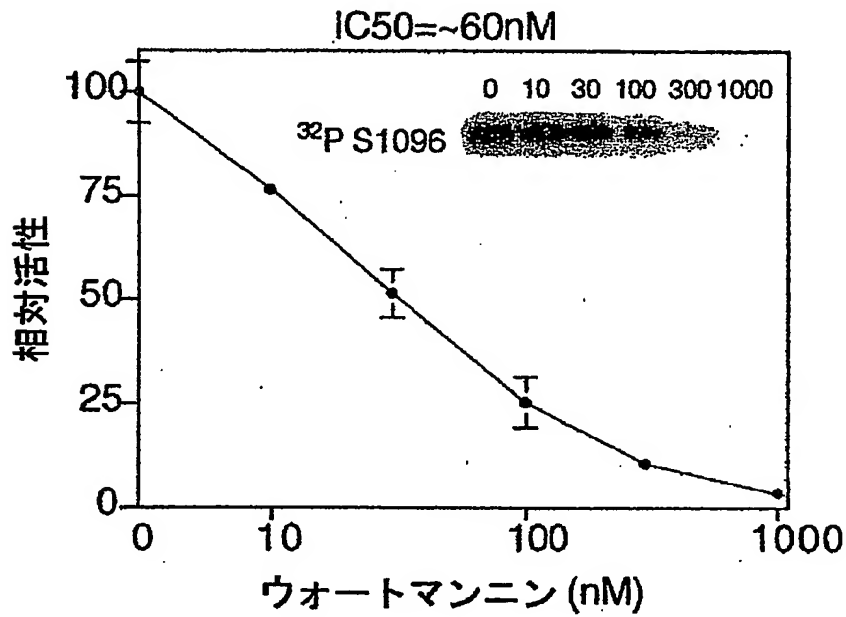
【図24】



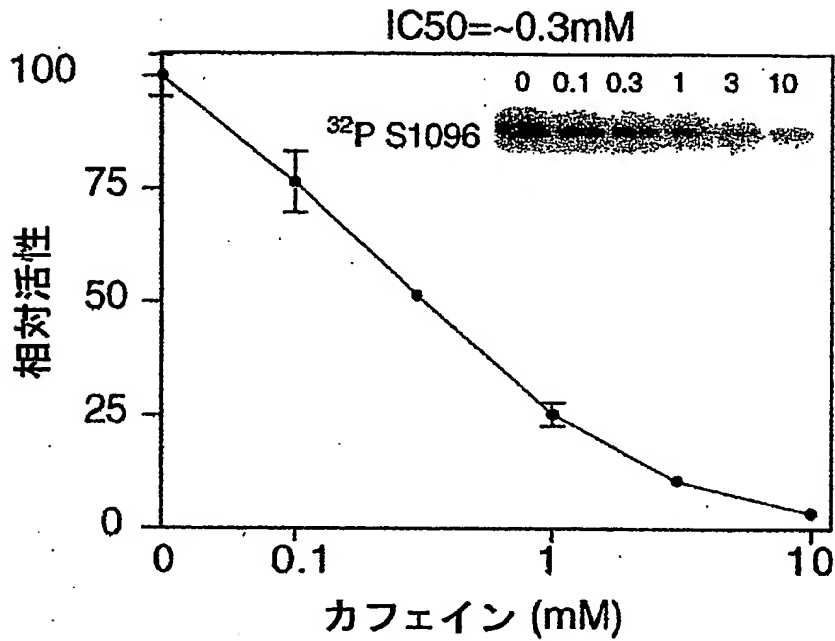
【図 25】



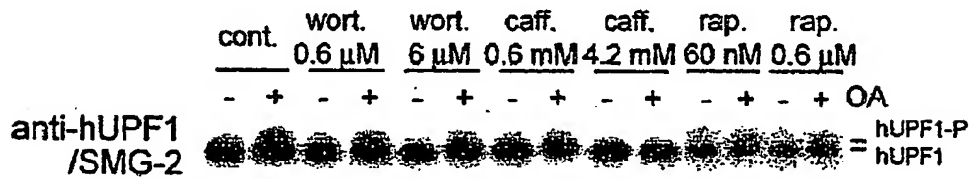
【図 26】



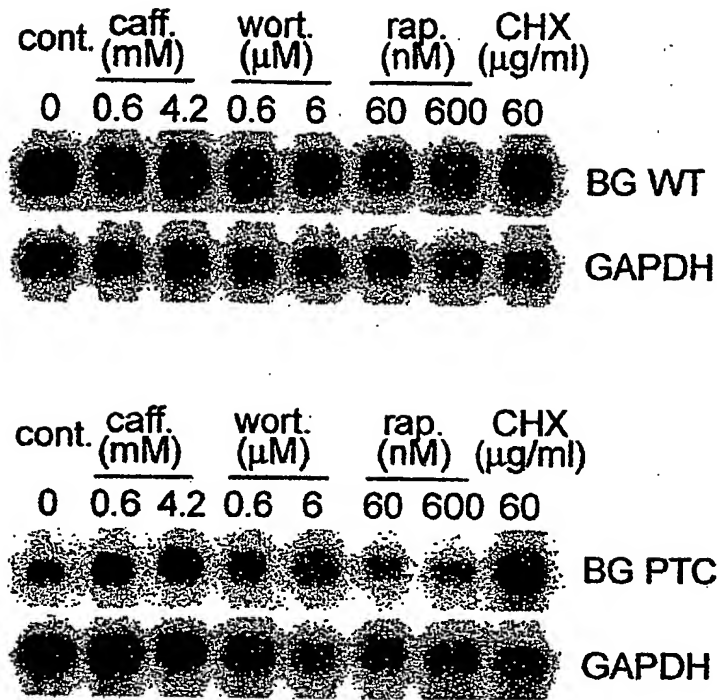
【図27】



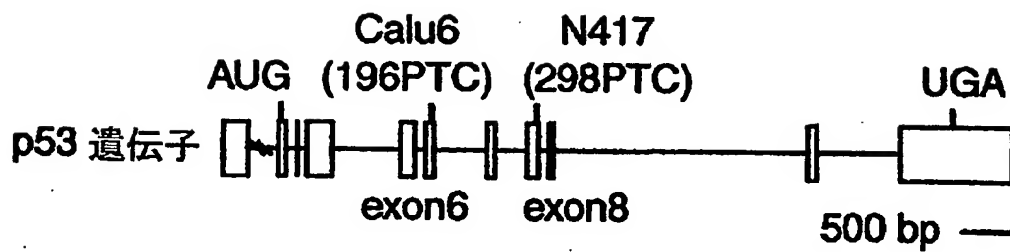
【図28】



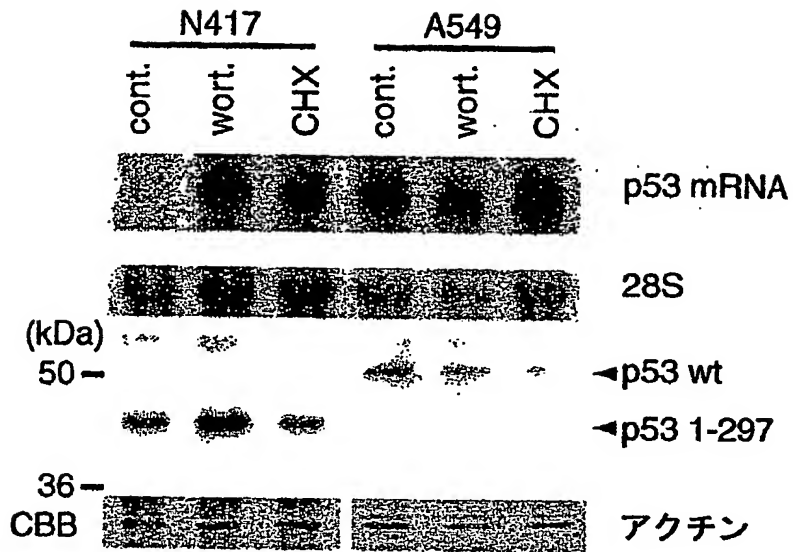
【図29】



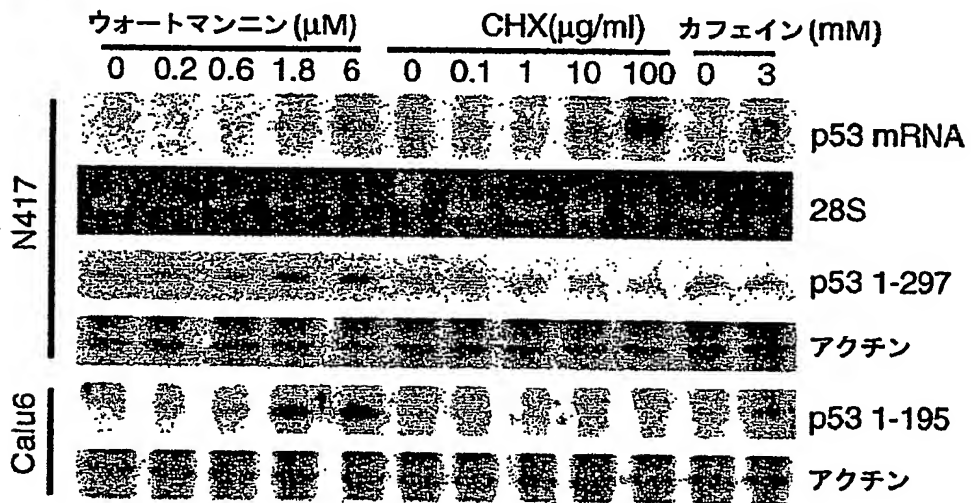
【図30】



【図31】



【図32】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ナンセンス変異により早期転写終始コドンを生じることが原因で生じる病態の治療剤のスクリーニング系を構築するのに有用な新規ポリペプチド及びそれをコードする新規ポリヌクレオチドを提供する。

【解決手段】 前記ポリペプチドは、フォスファチジルイノシトールキナーゼー関連キナーゼファミリーの1つであるSMG-1である。

【選択図】 なし

特2001-156088

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2001-156088
受付番号	50100750374
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成13年 8月16日

<認定情報・付加情報>
【提出日】

平成13年 5月24日

次頁無

特2001-156088

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [501207847]

1. 変更年月日	2001年 5月24日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都目黒区八雲4-4-8
氏 名	大野 茂男